

Received: 2012.05.22
Accepted: 2013.03.15
Published: 2013.04.15

Rola mikroflory jelitowej w patogenezie otyłości i cukrzycy

The role of gut microbiota in the pathogenesis of obesity and diabetes

Nina Stachowicz, Anna Kiersztan

Zakład Regulacji Metabolizmu, Instytut Biochemii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski

Streszczenie

Lawinowo wzrastająca liczba ludzi otyłych i z cukrzycą typu 2, to jeden z najpoważniejszych problemów zdrowotnych współczesnego świata. Do niedawna uważano, że główną przyczyną tego zjawiska jest zmiana stylu życia i nawyków żywieniowych. Według ostatnich doniesień ważną rolę w „epidemii” otyłości i cukrzycy może odgrywać także mikroflora jelitowa. U osób cierpiących na te choroby zaobserwowano zmiany w jej składzie. Dodatkowo to, że mikroflora jelitowa może wpływać na masę ciała, wrażliwość na insulinę, czy też metabolizm cukrów i lipidów doprowadziło do wysunięcia hipotezy, że zmiany w jej obrębie mogą się przyczyniać do patogenezы otyłości i cukrzycy. Lekami przeciwbakteryjnymi oraz pro- i prebiotykami próbuje się modyfikować florę jelit i w ten sposób wpływać na jej oddziaływanie z organizmem gospodarza. Uzyskane wyniki są bardzo obiecujące, skłaniają do dalszych analiz oraz wskazują mikroflorę jelitową jako potencjalny cel terapeutyczny w leczeniu otyłości i cukrzycy.

Słowa kluczowe:

mikroflora jelitowa • otyłość • cukrzyca typu 2 • cukrzyca typu 1 • krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe • *Bacteroidetes* • *Firmicutes* • zwierzęta „germ-free” • probiotyki • prebiotyki

Summary

The rapidly increasing number of people with obesity and type 2 diabetes is one of the most serious problems of the contemporary world. Until recently, it was thought that the main cause of this phenomenon is the change of lifestyle and dietary habits. According to recent reports, the gut microbiota may also play an important role in the “epidemic” of obesity and diabetes. Changes in its composition have been observed in people suffering from these diseases. In addition, the fact that the intestinal microbiota may affect body weight, insulin sensitivity or sugar and lipid metabolism has led to the hypothesis that these changes may contribute to the pathogenesis of obesity and diabetes. Scientists, using antibacterial drugs, pro – and prebiotics, are trying to modify the intestinal flora and thus affect its interaction with the host. The results are very promising, lead to further analysis and indicate gut microbiota as a potential therapeutic target for obesity and diabetes treatment.

Keywords:

Gut microbiota • obesity • type 2 diabetes • type 1 diabetes • short chain fatty acids • *Bacteroidetes* • *Firmicutes* • “germ-free” animals • probiotics • prebiotics

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1044746>

Word count: 6611
Tables: –
Figures: 6
References: 97

Adres autorki: dr Anna Kiersztan, Zakład Regulacji Metabolizmu, Instytut Biochemii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa, e-mail: akiersztan@biol.uw.edu.pl

Wykaz skrótów: **AMPK** – kinaza białkowa aktywowana przez AMP; **BMI** – indeks masy ciała; **BB-DP** – szczurze modele cukrzycy typu 1; **cAMP** – cykliczny AMP; **FIAT** – czynnik tkankowy indukowany głodem; **FXR** – receptor jądrowy FXR; **GPCRs** – receptory sprzężone z białkami G; **HOMA-IR** – test określający insulinooporność; **ID %** – procent identyczności; **LPS** – lipopolisacharyd; **NLRs** – receptory Nod-podobne; **PAMP** – wzorce molekularne związane z patogenami; **PRR** – receptory rozpoznające wzorce; **PYY** – peptyd YY; **SCFAs** – krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe; **T1D** – cukrzyca typu 1; **T2D** – cukrzyca typu 2; **TLRs** – receptory Toll-podobne; **VLDL** – lipoproteina o bardzo małej gęstości.

WSTĘP

Mikroflora jelitowa, ze względu na swą złożoność i różnorodność, od lat stanowi obiekt zainteresowania wielu badaczy zajmujących się pozornie odległymi dziedzinami nauki. Badania nad jej składem i funkcjami przeprowadzają zarówno dietetycy, jak i immunolodzy, epidemiolodzy, mikrobiolodzy oraz specjaliści analizujący ludzki metabolizm. Od dawna wiadomo, że mikroflora, dzięki rozkładowi węglowodanów złożonych, dostarcza organizmowi gospodarza wielu składników odżywczych oraz uczestniczy w przemianach krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych. Ponad pół wieku temu udowodniono też wpływ mikroflory na rozwijający się układ immunologiczny. Natomiast stosunkowo niedawno wykazano, że odpowiedź immunologiczna gospodarza związana jest ze składem jego mikroflory. Co więcej, w ostatnich latach zmiany w obrębie flory jelitowej wiąże się ze wzrostem zachorowań na różnego rodzaju alergię oraz choroby metaboliczne, w tym otyłość i cukrzycę typu 2 [80].

Dokładniejsze poznanie roli mikroflory jelitowej i jej wpływu na organizm gospodarza było możliwe dzięki badaniom na zwierzętach nazywanych w języku angielskim „germ-free”. Zwierzęta te, dzięki sterylnym warunkom hodowli, są wolne od mikroflory towarzyszącej. Do istotnych cech tych modeli badawczych należą m.in.: duża podatność na infekcje, obniżona aktywność enzymów trawiennych, zmniejszone wytwarzanie cytokin, mała różnorodność immunoglobulin, mniejsza masa ciała niż u osobników hodowanych w prawidłowych warunkach oraz – co bardzo interesujące – brak możliwości wywołania objawów otyłości za pomocą odpowiedniej diety [6,79].

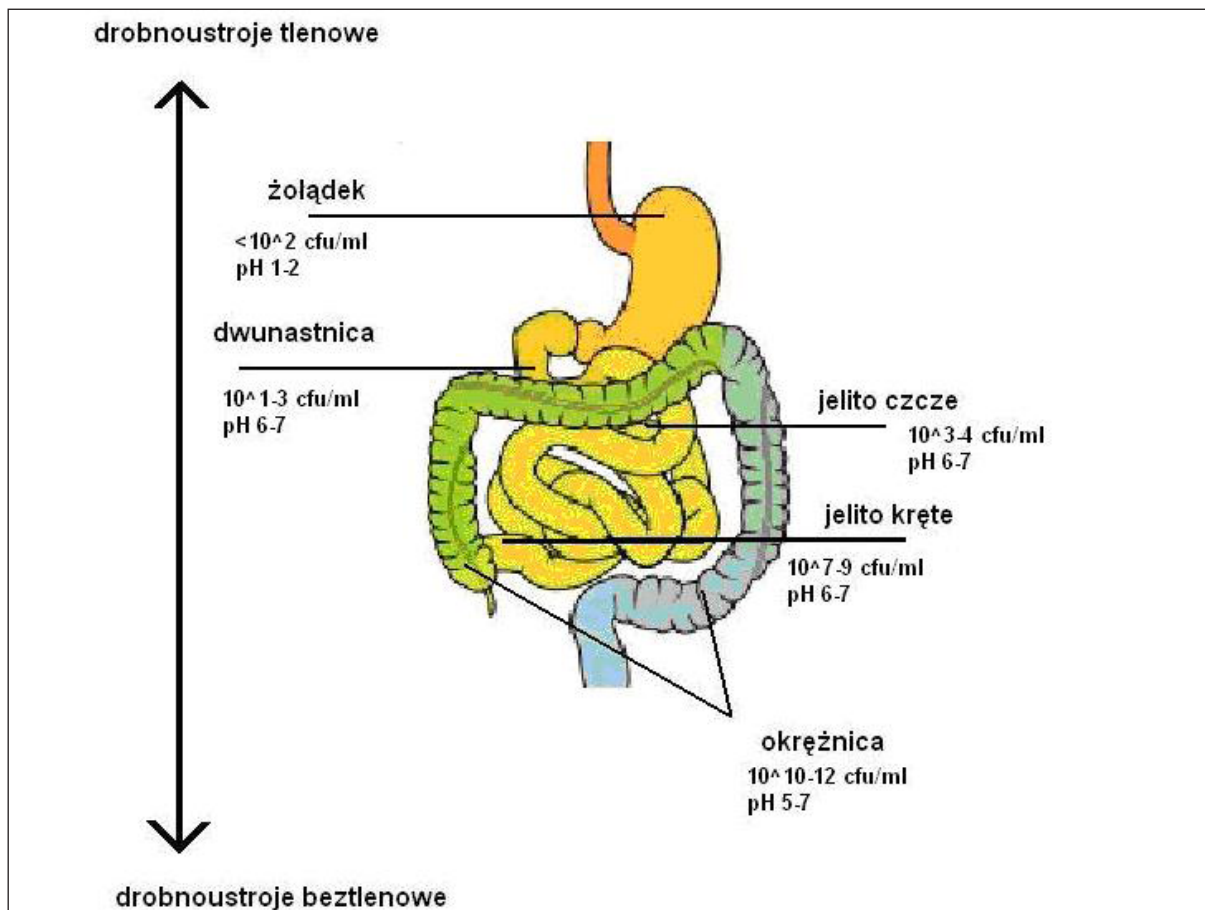
Przewód pokarmowy ssaków, a zwłaszcza jego końcowy odcinek, jest jednym z najgęściej upakowanych ekosystemów na świecie. Liczba bakterii w 1 g materiału pobranego z jelita sięga ponad 10^{12} organizmów. Zbiorowość ta wykazuje tak ogromny potencjał metaboliczny, że może pod tym względem „rywalizować” z wątrobą, która jest najbardziej złożonym narządem ludzkiego ciała pod względem przepro-

wadzanych procesów. Ponadto mikroflora zawiera większy zbiór informacji genetycznej niż genom zasiedlanego przez siebie gospodarza [62]. Dokładna liczba gatunków bakterii zasiedlających ludzki przewód pokarmowy nie jest znana. Ich liczebność i rozmieszczenie uzależnione jest od wielu czynników, z których najważniejsze to: dostępność tlenu, pożywienia oraz pH. Dolna część przewodu pokarmowego jest zasiedlana przez większą liczbą mikroorganizmów niż górna i skolonizowana jest głównie przez bakterie beztlenowe, podczas gdy w górnym odcinku bytują głównie drobnoustroje tlenowe. Strefą oddzielającą jest końcowy fragment jelita krętego [29] (ryc. 1).

Sposoby identyfikacji drobnoustrojów wchodzących w skład mikroflory jelitowej

Wiele ekosystemów, w tym także omawiany ekosystem jelit, stanowi wielką zagadkę. Dzieje się tak głównie dlatego, że większość zasiedlających go bakterii nie można wyhodować w laboratorium, używając tradycyjnych metod i dostępnych pożywek, gdyż nie poznano ich wymagań substratowych i środowiskowych. Problem ten został jednak częściowo rozwiązany dzięki rozwijającym się metodom biologii molekularnej, metagenomiki oraz zwiększonej wydajności technik sekwencjonowania. Pozwoliły one poznać i wykazać wpływ mikroflory jelitowej na metabolizm gospodarza, a w efekcie na jego stan zdrowia [62].

Nowo poznane metody są efektywnie wykorzystywane do analizy genu 16S rRNA wielu mikroorganizmów. Gen ten, o wielkości około 1,5 kb, zawiera w swojej strukturze silnie konserwowane sekwencje, utrwalane w toku ewolucji, dzięki czemu służy do klasyfikacji mikroorganizmów i pozwala na udokumentowanie historii ich ewolucji oraz tworzenie drzew filogenetycznych [60]. Grupowania i segregowania poznanych filotypów (zarówno na poziomie szczepów jak i gatunków) dokonano na podstawie tzw. „podobieństwa sekwencji” (% ID) genów 16S rRNA. Jako



Ryc. 1. Warunki fizjologiczne i rozmieszczenie flory bakteryjnej w jelitach (cfu – cell forming unit – jednostka tworząca kolonię, określa liczbę drobnoustrojów w danej objętości materiału)

wartość progową przy tego typu klasyfikacjach obiera się zwykle $ID > 97\%$ [87].

W celu identyfikacji i odpowiedniej klasyfikacji mikroorganizmów znajdujących się w jelicie tworzy się tzw. biblioteki klonów. Procedura pozwalająca na identyfikację bakterii końcowego odcinka przewodu pokarmowego rozpoczyna się od ekstrakcji genomowego DNA z próbek stolca i amplifikacji genu 16S rRNA metodą PCR. Następnie gen ten wbudowywany jest do wektora plazmidowego, którym transformuje się kompetentne komórki bakterii, np. *Escherichia coli*. Po tym etapie następuje inkubacja i selekcja transformantów oraz izolacja plazmidów. Na koniec wykonuje się sekwencjonowanie insertów plazmidowych, porównywanie uzyskanych sekwencji z już istniejącymi w bazach danych i ostatecznie tworzy się drzewa filogenetyczne [29].

Badania nad genem 16S rRNA, wykonane w ciągu ostatnich dziesięciu lat, stały się punktem zwrotnym w poznaniu różnorodności bakteryjnej mikroflory znajdującej się w ludzkim przewodzie pokarmowym [33]. Zsekwencjonowanie genów 16S rRNA, uzyskanych po amplifikacji materiału genetycznego pobranego z próbek stolca i błony śluzowej końcowych odcinków jelita, wykazało znacznie większe niż dotychczas przypuszczano zróżnicowanie znajdujących się w jelitach mikroorganizmów [61].

Większość, czyli 94-98% wszystkich wyizolowanych drobnoustrojów należy do czterech grup bakterii: *Firmicutes* (64%), *Bacteroidetes* (23%), *Proteobacteria* (8%) i *Actinobacteria* (3%). Pozostałe, choć nieliczne, stanowią bardzo zróżnicowaną taksonomicznie zbiorowość [41]. W mikroflorze jelitowej dominują głównie bakterie, ale archeony, wirusy i eukaryota również są tam obecne [29,87].

Powstawanie mikroflory jelitowej

Jelito płodu jest sterylne, ale jego kolonizacja rozpoczyna się już w czasie porodu. Dzieje się tak na skutek kontaktu dziecka z florą bakteryjną pochwy matki, ze znajdującymi się w jej kale bakteriami oraz drobnoustrojami napotkanymi w środowisku tuż po opuszczeniu organizmu matki. Kształtowanie się mikroflory kontynuowane jest w okresie postnatalnym i trwa, w zależności od organizmu, do około 12-24 miesiąca życia [38]. Na skład mikroflory jelitowej niemowląt może wpłynąć wiele czynników. Jednym z nich jest rodzaj porodu. W jelitach dzieci urodzonych przez tzw. poród naturalny, po kontakcie z florą bakteryjną pochwy matki, natychmiast pojawiają się bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*. U dzieci urodzonych przez cesarskie cięcie, te same drobnoustroje pojawiają się w jelicie dopiero po upływie około 30 dni [70]. Innym czynnikiem kształtującym mikroflorę jelitową niemowląt jest dieta. Różnice dotyczą po-

jawiania się określonych gatunków bakterii w zależności od karmienia dziecka naturalnym mlekiem matki bądź mlekiem syntetycznym. W przeprowadzonych badaniach, w których nie brano pod uwagę rodzaju porodu, a tylko rodzaj spożywanego mleka, wykazano, że u niemowląt karmionych mlekiem matki bakterie z rodzaju *Bifidobacterium* pojawiają się wcześniej niż u dzieci karmionych mlekiem syntetycznym. Produkty fermentacji, przeprowadzanej przez bakterie tej grupy (kwas octowy i mlekowy), chronią dziecko przed patogennymi szczepami *E. coli* oraz *Clostridium perfringens* [37]. Dodatkowym czynnikiem wpływającym na mikroflorę jelit w początkowym okresie życia jest okres ciąży, w którym dochodzi do porodu. W jelitach dzieci urodzonych przed planowanym terminem, czyli u tzw. wcześniaków, mikroflora jelitowa pojawia się później i może znacząco różnić się od flory dzieci urodzonych „w terminie” [69]. To w jaki sposób i przez jakie mikroorganizmy jelito niemowlęcia zostanie zasiedlone zależy także od wielu innych czynników, w tym poziomu higieny oraz przyjmowanych leków [70].

Na podstawie badań, w których analizowano skład i zmienność mikroflory w trakcie życia, stworzono profile mikrobiologiczne flory jelitowej dla niemowląt i dorosłych. Mikroflora noworodków składa się w większości z bakterii z rodzaju: *Bifidobacterium*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* oraz rodziny *Enterobacteriaceae*. W skład flory jelit dorosłych, opisanej szerzej w kolejnym rozdziale, wchodzi głównie bakterie należące do dwóch typów: *Bacteroidetes* i *Firmicutes*. Obie mikroflory, dorosłych i dzieci, ograniczone są do kilku głównych grup bakterii, co oznacza, że cała mikroflora jelit ewoluowała do obecnego składu pod silną presją selekcyjną [56].

U bliźniąt dwujajowych obserwuje się bardzo duże podobieństwo w składzie mikroflory jelitowej tuż po porodzie oraz analogiczne jej zmiany w ciągu życia. Takie obserwacje sugerują, że mimo wielu czynników wpływających na florę jelitową, głównymi elementami odpowiadającymi za jej skład mogą być czynniki genetyczne i środowiskowe [71]. Istotny wpływ genotypu na skład flory jelitowej potwierdza także inne badanie, przeprowadzone tym razem u bliźniąt jednojajowych i ich matek [88].

Wpływ różnych czynników na skład mikroflory jelitowej

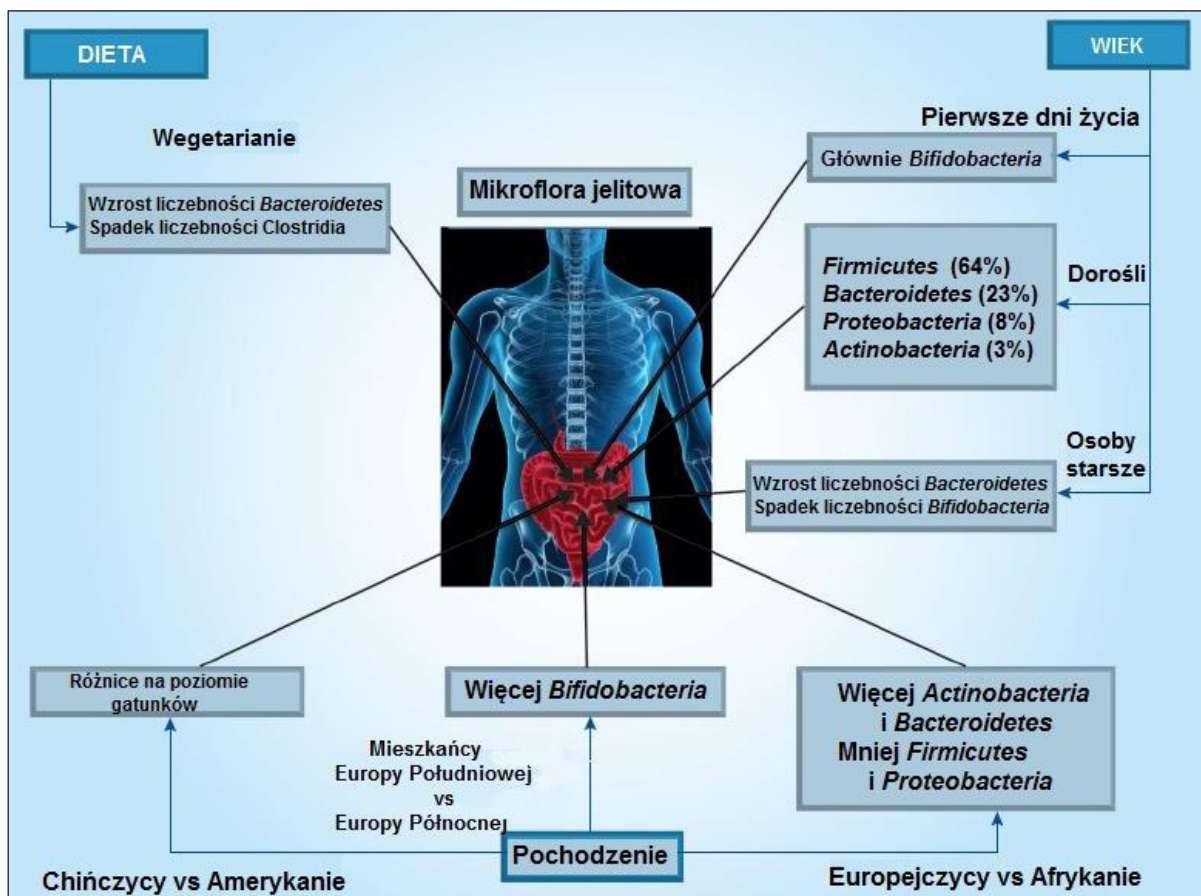
Jednym z najistotniejszych czynników wpływających na skład mikroflory jelitowej jest dieta. Przeprowadzone badania wykazują, że zmiana diety z nisko- na wysokotłuszczową powodowała znaczące różnice ilościowe w składzie mikroflory. Obserwowano spadek liczebności bakterii należących do typu *Bacteroidetes* przy jednoczesnym, znaczącym wzroście liczebności *Firmicutes* i *Proteobacteria*. Zmiany te były niezależne od występowania bądź braku objawów otyłości u badanych osób [46]. Podobne wyniki uzyskali naukowcy porównujący florę bakteryjną dzieci karmionych wysokoenergetyczną dietą zachodnią oraz dzieci z regionów afrykańskich. Mikroflora jelitowa dzieci pochodzących z leżącego w Afryce Burkina Faso, w porównaniu z dziećmi karmionymi dietą zachodnią, zawierała znacznie więcej bakterii z typu *Bacteroidetes* oraz odpowiednio mniej bakterii nale-

żących do *Firmicutes*. Jednocześnie, w próbkach kału dzieci z Afryki, stwierdzono obecność bakterii z rodzaju *Prevotella* i *Xylanibacter* – drobnoustrojów zdolnych do wytwarzania enzymów hydrolizujących celulozę i ksylan oraz większą zawartość krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych, będących dodatkowym źródłem energii. Mikroflora jelitowa dzieci z Burkina Faso różniła się także między sobą u poszczególnych badanych. Jest to spowodowane pochodzeniem badanych dzieci (regiony bogate i biedne). Na podstawie wyników tych badań stwierdzono, że różnice w składzie mikroflory są ściśle powiązane z dietą. Poszczególne drobnoustroje flory pojawiają się w niej w zależności od składu spożywanych pokarmów. Tłumaczy to także obecność *Prevotella* i *Xylanibacter* w mikroflorze dzieci z regionów afrykańskich, których dieta obfituje w składniki roślinne [25]. Opisaną wyżej zależność potwierdzają badania mikroflory jelitowej osób odżywiających się dietą wegetariańską. Wykazano u nich spadek liczebności oraz zmiany różnorodności bakterii z rodzaju *Clostridium* oraz wzrost liczebności *Bacteroidetes* [59] (ryc. 2).

Okazuje się jednak, że nie wszyscy naukowcy otrzymali takie same wyniki. Ley i wsp. wykazali identyczną zawartość *Bacteroidetes* i *Firmicutes* u osób otyłych odżywiających się wysokotłuszczową dietą oraz po zmianie diety na niskokaloryczną [57]. Pojawiły się również wyniki badań, które sugerują, że nie ma żadnej korelacji między stosunkiem *Bacteroidetes/Firmicutes* a dietą i BMI [4]. Potwierdzenie istnienia tej zależności wciąż wymaga wielu badań i analiz uwzględniających wszystkie możliwe czynniki, wpływające na wiarygodność wyników [50].

Na skład mikroflory jelitowej poza dietą mają wpływ także: genotyp, wiek, płeć oraz warunki środowiskowe. Przebadano mikroflorę jelitową osób pochodzących z różnych regionów świata. Zaobserwowano różnice w składzie mikroflory między mieszkańcami Europy Północnej i Południowej, które polegały na większej zawartości bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* u osób zamieszkujących Europę Południową [35]. Spore różnice wykazano także w składzie flory jelitowej między Europejczykami i Afrykanami. W skład flory jelitowej osób zamieszkujących Europę wchodzi znacznie mniej *Actinobacteria* i *Bacteroidetes* oraz więcej *Firmicutes* i *Proteobacteria* [25]. Znaczna odrębność obserwowana jest także między profilami mikrobiologicznymi Chińczyków i Amerykanów [58] (ryc. 2).

Mikroflora jelitowa ulega zmianie wraz z wiekiem, o czym mogą świadczyć różnice pomiędzy składem flory jelitowej dzieci, osób dorosłych i w podeszłym wieku [9,13]. Jak opisano wcześniej, mikroflora jelitowa noworodków zdominowana jest przez bakterie z rodzaju *Bifidobacterium*, ale w ciągu życia ulega ona dynamicznym zmianom, tworząc ostatecznie bardzo złożony ekosystem [71]. Między 3 a 52 tygodniem życia zmniejsza się liczebność populacji *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* i *Clostridium*. Natomiast w mikroflorze jelit dzieci w wieku 3–12 lat wykazano wzrost liczebności populacji *Bacteroides fragilis* [90]. W przeprowadzonych na szeroką skalę badaniach potwierdzono, że w ciągu pierwszych dwóch lat życia dochodzi do znaczących



Ryc. 2. Wpływ różnych czynników na skład mikroflory jelitowej (na podstawie [2], za zgodą Wydawnictwa Future Medicine)

zmian w mikroflorze jelitowej, a między 2 a 18 rokiem życia jej skład nie ulega już większym wahaniom [34].

Porównanie flory jelitowej młodzieży i osób dorosłych wykazało zwiększoną zawartość *Bifidobacterium* i *Clostridium* w mikroflorze młodzieży [1]. U osób starszych obserwuje się zwiększoną liczebność bakterii z rodzaju *Bacteroidetes*, mniejszą różnorodność drobnoustrojów w porównaniu z osobami dorosłymi oraz obniżoną zawartość bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* i *Clostridium* [97]. Jednak nowsze wyniki badań, nie potwierdzają spadku liczebności bakterii z rodzaju *Clostridium*, a wręcz przeciwnie wskazują na wzrost ich liczebności u osób starszych [23].

Funkcje mikroflory jelitowej i jej wpływ na metabolizm gospodarza

Mikroflora jelitowa spełnia istotne funkcje w organizmie gospodarza, związane zarówno z układem pokarmowym, jak i immunologicznym. Odpowiada też za prawidłowy przebieg i regulację wielu procesów metabolicznych. Jej obecność jest niezbędna, a upośledzenie funkcji może prowadzić do wielu znaczących nieprawidłowości oraz problemów w utrzymaniu homeostazy organizmu [80].

Jedną z wielu korzyści wynikających z obecności bakterii w przewodzie pokarmowym jest ochrona organizmu gospo-

darza przed patogenami. Mikroflora jelit syntetyzuje wiele związków chemicznych służących do aktywnej obrony przed inwazją enteropatogenów. Dzięki tym swoistym substancjom niemożliwa jest kolonizacja jelit przez bakterie z rodzaju *Clostridium*, np. *Clostridium difficile* czy *Clostridium cocleatum*. Co ciekawe, zasiedlające jelita szczepy *E. coli* wytwarzają substancje stanowiące barierę przeciwko patogenym szczepom *E. coli*. Wchodzące w skład flory jelitowej bakterie z rodzaju *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* wytwarzają substancje antybakteryjne (aktywne zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo*), które skierowane są przeciwko takim patogenom jak *Listeria monocytogenes* czy *Salmonella Typhimurium* [70].

Drobnoustroje bytujące w jelitach uczestniczą ponadto w rozkładzie obecnych w pożywieniu toksyn i kancerogenów, syntezie mikroelementów, metabolizmie leków oraz wchłanianiu elektrolitów i soli mineralnych [67].

Kolejną istotną rolą mikroflory jest jej wpływ na budowę końcowego odcinka przewodu pokarmowego. Na obszarach z dużą liczbą bakterii obserwuje się zwiększoną liczbę i długość kosmków jelitowych w porównaniu z regionami mniej licznie zasiedlonymi. Analogiczne różnice w budowie kosmków jelitowych wykazano także między zwierzętami hodowanymi w prawidłowych warunkach a zwierzętami „germ-free” [70]. Zależność ta potwierdza hipotezę o dodatnim wpływie mikroflory jelitowej na dojrzewanie i wy-

mianę enterocytów. Enterocyty to komórki odpowiedzialne za wchłanianie substancji w obrębie jelita cienkiego. Zatem, im więcej drobnoustrojów na danym odcinku jelita tym intensywniejszy proces powstawania enterocytów i większe wchłanianie w tym obszarze [67].

Mikroflora ma także wpływ na funkcje motoryczne jelit. Potwierdzono eksperymentalnie, że rozprzestrzenianie się kompleksów odpowiedzialnych za motorykę jelit zachodzi zdecydowanie wolniej u zwierząt „germ-free” niż u „normalnych” osobników. Jest to także ściśle powiązane z szybkością opróżniania żołądka i transportem wewnątrz jelit [7].

WPLYW MIKROFLORY JELITOWEJ NA HOMEOSTAZĘ ENERGETYCZNĄ I MAGAZYNOWANIE TŁUSZCZU W ORGANIZMIE GOSPODARZA

Związek między mikroflorą jelitową a funkcjonowaniem szlaków metabolicznych w organizmie człowieka jest słabo poznany. Wiele przesłanek pozwala jednak sądzić, że istnieje korelacja między mikroflorą jelitową a funkcjonowaniem szlaków metabolicznych i jest ona bardzo istotna w utrzymaniu homeostazy organizmu [16]. Badania ostatnich lat sugerują, że zaburzeniom metabolicznym towarzyszą zmiany w mikroflorze jelitowej. Jednym z badań pozwalających na wysunięcie tej hipotezy było doświadczenie przeprowadzone na opisanych szerzej w dalszym fragmencie pracy myszach *ob/ob*. Podawanie antybiotyków tym zwierzętom – norfloksacyny i ampicyliny, spowodowało zmiany w składzie mikroflory jelitowej, a przy tym poprawę glikemii na czczo, tolerancji na glukozę oraz wrażliwości komórek na insulinę w porównaniu z grupą kontrolną, nieotraktowaną antybiotykiem [65]. W innym badaniu myszom *ob/ob* podawano ampicylinę i neomycynę, po czym zaobserwowano ogólnoustrojowy spadek poziomu endotoksyn oraz czynników zapalnych we krwi badanych osobników [15].

Oddziaływania mikroflory jelitowej na homeostazę energetyczną organizmu gospodarza mogą zachodzić na wielu płaszczyznach i nazywane są często „hipotezą magazynowania” (the storage hypothesis) [13,17]. Po pierwsze, mikroflora jelitowa, dzięki syntezie i wydzielaniu wielu związków chemicznych, może wpływać na podwojenie gęstości naczyń włosowatych w nabłonku jelita cienkiego, co skutkuje zwiększonym wchłanianiem monosacharydów w tym odcinku przewodu pokarmowego [83]. Po drugie, mikroorganizmy bytujące w jelitach syntetyzują hydrolazy glikozydowe – enzymy niezbędne do rozkładania złożonych, roślinnych polisacharydów wchodzących w skład spożywanych produktów. Organizm ludzki ma ograniczone możliwości jeśli chodzi o wytwarzanie enzymów tej grupy [39]. Dzięki symbiozie człowieka i bakterii jelitowych możliwe jest pozyskiwanie energii ze związków, które nie są rozkładane przez enzymy trawienne, a które w wyniku fermentacji przeprowadzanej przez mikroflorę dostają się do krwiobiegu. Dziennie możemy w ten sposób dostarczyć 80-200 kcal, czyli ~4-10% dziennego zapotrzebowania osoby dorosłej [46]. Związkami pozyskiwanymi dzięki wspomnianej symbiozie są np. krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe – SCFAs (short chain fatty acids), do których

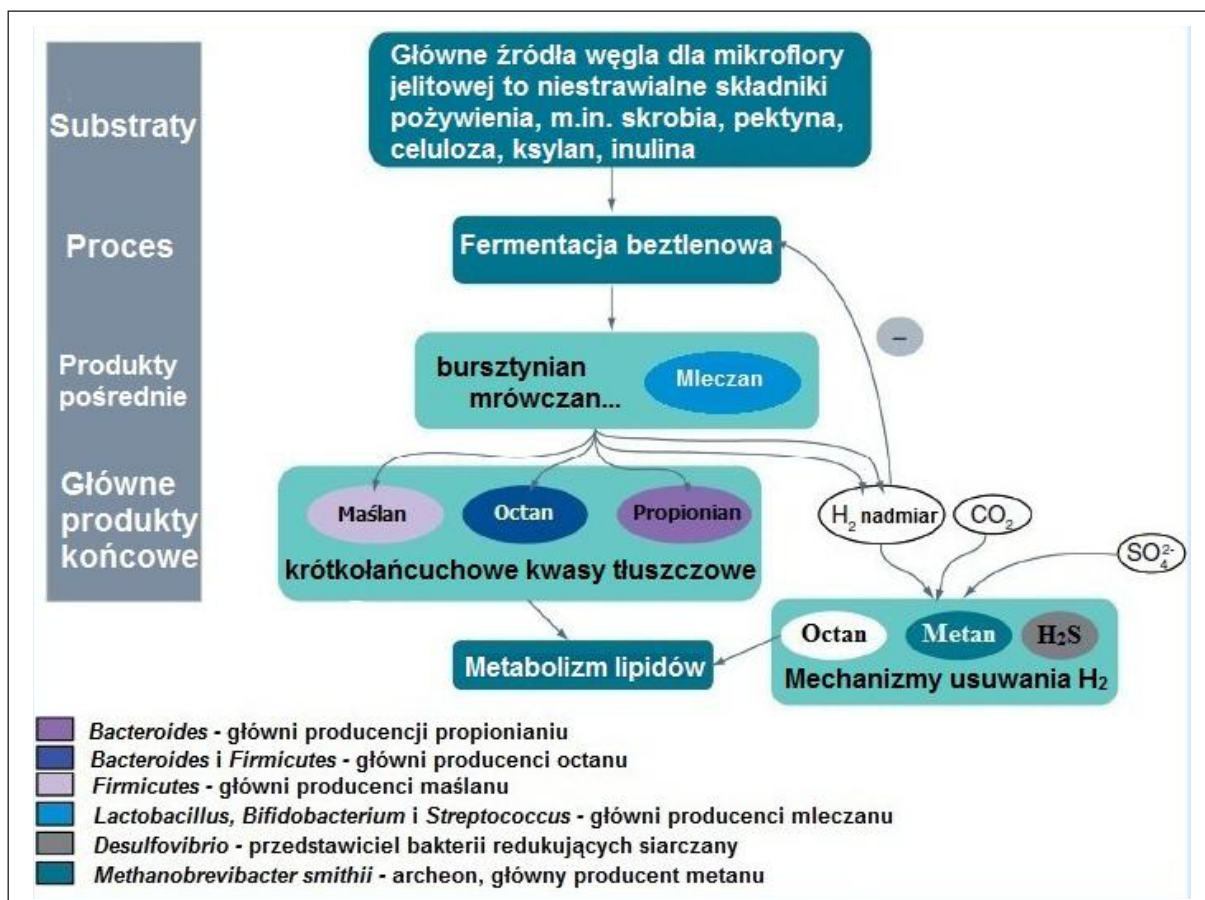
należą m.in. octan, propionian i maślan, przy czym kwas octowy jest dominującym typem SCFAs [96]. Jednym ze SCFAs stanowiącym źródło energii dla organizmu jest kwas propionowy, który może być wykorzystywany w procesie syntezy glukozy i lipidów [78] (ryc. 3).

Opisano wiele funkcji jakie pełnią krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe. Jedną z nich jest stymulowanie wydzielania peptydu YY – PYY (peptide YY) [28]. PYY jest hormonem, który zmniejsza motorykę jelit, spowalnia przechodzenie treści pokarmowej w jelitach, a przez to zwiększa wchłanianie składników odżywczych. Jego działanie jest obecnie intensywnie badane, gdyż może wpływać na rozwój otyłości [45].

SCFAs pełnią też funkcję cząsteczek sygnałowych. Kwasy propionowy, octowy i maślowy są ligandami dla receptorów sprzężonych z białkami G: Gpr41 oraz Gpr43, należącymi do grupy receptorów komórkowych GPCRs (G-protein coupled receptors) [11]. Oba wymienione receptory są ekspresjonowane na komórkach nabłonka. Przeprowadzone badania sugerują, że Gpr41 jest regulatorem równowagi energetycznej organizmu przez oddziaływanie z metabolitami wytwarzanymi przez mikroflorę. Gpr43 proponowany jest jako „molekularny łącznik” pomiędzy dietą, mikroflorą przewodu pokarmowego, odpornością oraz odpowiedzią zapalną [64]. Wykazano, że myszy pozbawione receptorów Gpr41 i Gpr43 są chudsze niż ich dzikie odpowiedniki [10].

Wpływ maślanu na regulację homeostazy energetycznej organizmu może się wiązać ze stymulacją wytwarzania leptyny w adipocytach i indukcją wydzielania GLP-1 przez komórki L jelita [68], a także nasileniem procesu termogenezy, wzrostem utleniania kwasów tłuszczowych oraz aktywnością mitochondriów w obrębie mięśni i brunatnej tkanki tłuszczowej [43]. Ponadto zauważono, że maślan może wykazywać działanie przeciwzapalne, obniżając uwalnianie cytokin i chemokin [68]. U otyłych myszy karmionych wysokotłuszczową dietą wzbogaconą o maślan zaobserwowano zahamowanie, a nawet cofnięcie się insulinooporności [43]. W innym badaniu zaobserwowano zaś, że spożywanie diety o niskiej zawartości węglowodanów skutkuje obniżonym stężeniem kwasu maślowego w próbkach kału oraz zmniejszeniem liczby bakterii, które go wytwarzają [31]. Na podstawie tych informacji można wysunąć hipotezę, że maślan korzystnie wpływa na metabolizm w stanach patologicznych, natomiast nie odgrywa większej roli w warunkach prawidłowych [50].

Mechanizmem, dzięki któremu mikroflora jelit może sprzyjać magazynowaniu tłuszczu jest blokowanie ekspresji czynnika tkankowego indukowanego głodem – FIAF (fasting-induced adipocyte factor). FIAF, znany także pod nazwą białka podobnego do angiopoetyny 4, hamuje działanie lipazy lipoproteinowej – LPL (lipoprotein lipase) – enzymu odpowiedzialnego za magazynowanie energii w postaci tłuszczu. Co więcej, FIAF ułatwia uwalnianie kwasów tłuszczowych ze związanych z lipoproteinami trójglicerydów. Zatem obniżona ekspresja FIAF prowadzi do zwiększenia aktywności LPL w komórkach tłuszczowych i nasilenia procesu magazynowania energii w postaci tłuszczu [6] (ryc. 4).

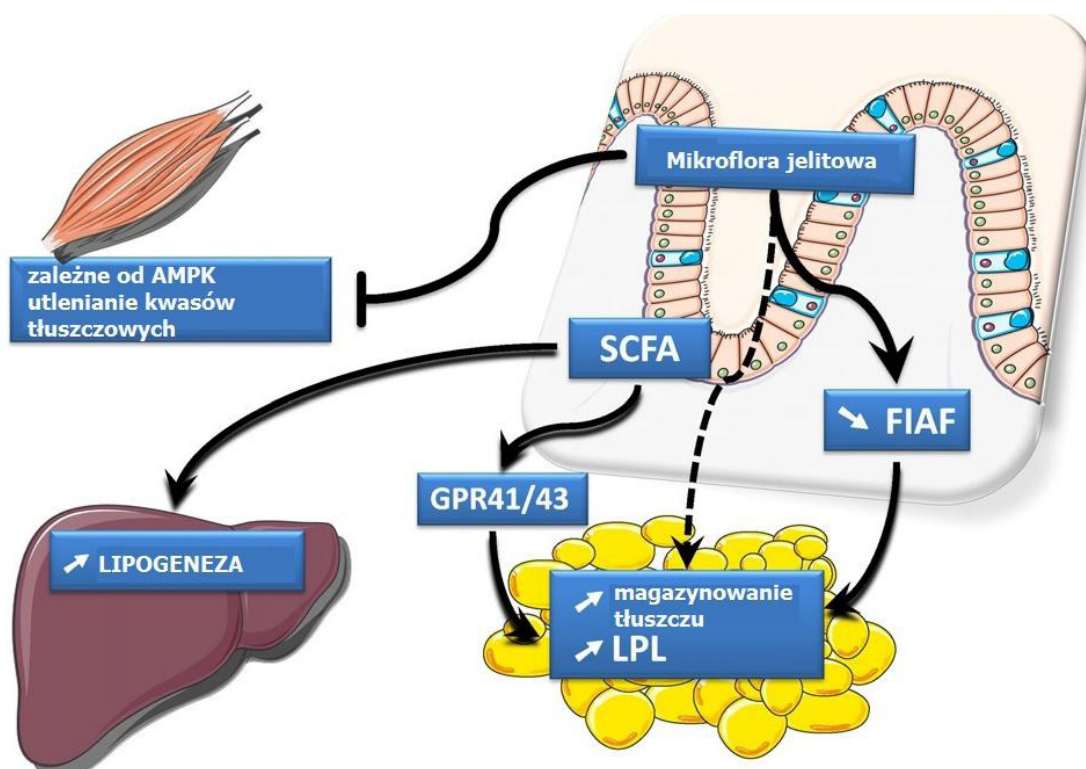


Ryc. 3. Procesy fermentacyjne przeprowadzane przez mikroorganizmy wchodzące w skład mikroflory jelitowej (na podstawie [2], za zgodą Wydawnictwa Future Medicine)

Mikroflora jelitowa może również wpływać na metabolizm lipidów gospodarza, hamując aktywność kinazy białkowej aktywowanej przez AMP – AMPK (adenosine monophosphate activated protein kinase) [5] (ryc. 4). AMPK jest enzymem występującym u wszystkich organizmów eukariotycznych, który kontroluje status energetyczny na poziomie komórkowym [48]. Myszy „germ-free”, mimo karmienia dietą zachodnią, zawierającą duże ilości cukrów i tłuszczów, bronią się przed otyłością. Taki stan możliwy jest dzięki dużej aktywności ufosforylowanej postaci AMPK w wątrobie i mięśniach szkieletowych tych zwierząt, a więc wysokiej wydajności utleniania kwasów tłuszczowych w obu tych organach [5]. Aktywna AMPK fosforyluje karboksylazę acetylo-CoA, co prowadzi do spadku stężenia malonylo-CoA. Związek ten hamuje palmitoilotransferazę karnitynową – enzym związany z przenoszeniem długołańcuchowych kwasów tłuszczowych do mitochondriów. Skutkiem tego jest aktywacja procesu utleniania kwasów tłuszczowych [68].

Poza opisanymi wyżej zależnościami między mikroflorą jelitową a magazynowaniem tłuszczu (ryc. 4), należy wspomnieć także o kwasach żółciowych, których metabolizm potencjalnie powiązany jest z mikroflorą jelitową. Kwasy żółciowe syntetyzowane są w wątrobie i magazynowane w woreczku żółciowym. Ich główną funkcją jest ułatwienie trawienia tłuszczu oraz wchłaniania witamin rozpuszczalnych w tłuszczach [68]. Przez długi czas uważano, że są one

jedynie związkami uczestniczącymi w metabolizmie lipidów. W ciągu ostatnich dziesięciu lat pojawiło się jednak przypuszczenie, że mogą pełnić rolę cząsteczek sygnałowych, regulujących aktywność kilku szlaków metabolicznych [54]. Ponadto okazało się, że mikroflora jelitowa wpływa na syntezę kwasów żółciowych i ich przemiany w organizmie. Interesujące jest to, że u myszy „germ-free” obserwuje się zmiany w proporcji kwasów żółciowych w porównaniu z osobnikami hodowanymi w „normalnych”, niesterylnych warunkach [85]. Kwasy żółciowe mogą aktywować szlaki sygnałowe zarówno poprzez receptory jądrowe, jak i opisane wcześniej GPCRs, czyli receptory znajdujące się na powierzchni komórki. FXR (farnesoid X receptor) był pierwszym zidentyfikowanym receptorem jądrowym, aktywowanym przez kwasy żółciowe. We krwi myszy pozbawionych tego receptora (FXR^{-/-}) obserwuje się podwyższone stężenia trójglicerydów i glukozy. Wskazuje to, że może on brać udział w szlakach metabolizmu glukozy i lipidów [54,85]. Innym receptorem aktywowanym przez kwasy żółciowe jest TGR5. Jest on receptorem błonowym, eksprymowanym głównie w brunatnej tkance tłuszczowej i jelicie cienkim [86]. Przekazywanie sygnału poprzez TGR5 powoduje zwiększenie poziomu cAMP, a to z kolei prowadzi do wzmożonego zużycia energii w obrębie brunatnej tkanki tłuszczowej, a więc może zapobiegać powstawaniu insulinooporności i otyłości. Inną funkcją tego receptora jest aktywacja enzymu przekształcającego tyrozynę w trójiodotyroninę. Sugeruje się,



Ryc. 4. Wpływ mikroflory jelitowej na magazynowanie energii w organizmie (na podstawie [17], za zgodą Wydawnictwa Elsevier); ↑ – wzrost ilości związku/intensywności procesu; ↓ – spadek ilości związku/intensywności procesu. AMPK – kinaza białkowa zależna od AMP; SCFA – krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe; FIAF – czynnik tkankowy indukowany głodem; LPL – lipaza lipoproteinowa; GPR41/GPR43 – receptory sprzężone z białkami G

że przez takie oddziaływanie receptor ten może zwiększać tempo przemiany materii i w pozytywny sposób wpływać na gospodarkę energetyczną organizmu [8,94].

ZMIANY W MIKROFLORZE JELITOWEJ TOWARZYSZĄCE OTYŁOŚCI

Według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO) w 2005 roku na świecie było 400 mln osób otyłych, a 1,6 mld miało nadwagę. Prognozy na 2015 rok przewidują, że liczba osób otyłych powyżej 15 roku życia wzrośnie do około 700 mln, czyli prawie dwa razy więcej niż przed dziesięcioma laty. Wzrośnie także liczba osób z nadwagą do około 2,3 mld [22]. Otyłość powiązana jest z wieloma schorzeniami, których wzrost częstości występowania także jest znaczący. Zalicza się do nich: wszelkiego rodzaju stany zapalne, insulinooporność, cukrzycę typu 2, stłuszczeniowe zapalenie wątroby [74] oraz nadciśnienie, choroby układu sercowo-naczyniowego i nowotwory [44].

Rozpoczęcie badań nad wpływem mikroflory jelitowej na patogenezę otyłości związane było z przełomowym eksperymentem, który polegał na przeniesieniu ludzkiej mikroflory jelitowej do jelit myszy „germ-free”. Skolonizowane ludzką mikroflorą zwierzęta były stabilne pod kątem zmian jakie zaszły w ich organizmie, przekazywały nabytą cechę potomstwu i dodatkowo zwiększały jej różnorodność. W kolejnych etapach eksperymentu analizowano różnice w składzie mikroflory jelitowej w zależności od diety. Okazało się, że wprowadzenie myszom diety wysokotłuszczowej powoduje zmiany w obrębie ich flory w ciągu jednego dnia. Zmianie

ulega także aktywność wielu szlaków metabolicznych przeprowadzanych przez zasiedlające jelito drobnoustroje, co sugeruje, że mogła nastąpić także zmiana w ekspresji ich genów. Badania te wykazały następnie możliwość wywołania otyłości na skutek przeniesienia mikroflory otyłych ludzi do jelit zdrowych zwierząt [89]. Po scharakteryzowaniu drobnoustrojów bytujących w końcowym fragmencie przewodu pokarmowego, przeprowadzono wiele kompleksowych analiz. Badania tego typu zależnośći przeprowadza się głównie na zwierzętach, ponieważ pozwala to na uniknięcie kłopotliwych różnic w diecie, środowisku i genotypie, które ewentualnie mogłyby utrudnić interpretację wyników. W jednym z eksperymentów badacze porównali zmodyfikowane genetycznie, pozbawione leptyny, otyłe myszy (*ob/ob*) i myszy chude (*ob/+* i *+/+*) [87]. Jako element różnicujący wybrano leptynę, ponieważ jest ona czynnikiem regulującym łaknienie [36]. Wykazano, że drobnoustroje bytujące w jelitach myszy *ob/ob* mają enzymy, dzięki którym możliwy jest rozkład niestrawialnych w inny sposób polisacharydów, będących częścią pożywienia. Analiza stolców otyłych osobników wykazała ponadto większą ilość końcowych produktów fermentacji, takich jak kwas octowy i masłowy oraz mniejszą zawartość kalorii. Uzyskane wyniki skłoniły badaczy do przypuszczenia, że mikroflora jelitowa u osobników otyłych może ułatwiać pozyskiwanie dodatkowych kalorii z trawionego pożywienia. Dalsze badania miały na celu sprawdzenie, czy flora jelitowa ma wpływ na masę ciała. W tym celu przeniesiono drobnoustroje z jelit otyłych myszy *ob/ob* do jelit myszy „germ-free”. Po dwóch tygodniach od kolonizacji jelit myszy „germ-free” zaobserwowano, że pozyskiwały one więcej kalorii z pożywienia i wykazywały

znacznie większy przyrost tkanki tłuszczowej niż myszy, które otrzymały bakterie od szczupłych, zdrowych osobników (odpowiednio: $47 \pm 8,3\%$ i $27 \pm 3,6\%$). Uzyskane wyniki sugerują, że ilość pozyskiwanych kalorii z trawionego pożywienia może zależeć od składu mikroflory jelitowej, a to z kolei może potwierdzać udział flory jelitowej w patogenezie otyłości [87].

Dodatkowo zauważono, że u myszy, które są podatne na wystąpienie insulinooporności oraz stłuszczeniowego zapalenia wątroby, jednego z najczęstszych powikłań występujących u osób otyłych, obserwuje się nieprawidłowy poziom metabolitów związanych z przemianami fosfatydylocholin w krwi i w moczu. Karmienie myszy dietą wysokotłuszczową powoduje, że ich mikroflora zaczyna przekształcać pochodzącą z pożywienia cholinę w hepatotoksyczne metyloaminy. Cholina jest niezbędna do wydzielania lipoproteiny o bardzo małej gęstości – VLDL (very low density lipoprotein). VLDL syntetyzowana jest w wątrobie, a jej główną funkcją jest transport lipidów z wątroby do komórek tłuszczowych – adipocytów. Zmniejszając biodostępność choliny mikroflora jelitowa może uczestniczyć w patogenezie insulinooporności oraz stłuszczeniowego zapalenia wątroby. Może także inicjować peroksydację lipidów w obrębie organizmu gospodarza [30].

Różnice w składzie mikroflory jelitowej u szczupłych i otyłych osobników

Analizy genu 16S rRNA mikroorganizmów wchodzących w skład flory jelitowej zdrowych myszy oraz osobników otyłych wykazały różnice w składzie ich mikroflory. W większości badań, analogicznie do wyników badań nad dietą i jej wpływem na mikroflorę jelitową, w mikroflorze otyłych myszy zauważono prawie 50% spadek liczebności bakterii należących do typu *Bacteroidetes* oraz proporcjonalny wzrost liczebności bakterii typu *Firmicutes* [55]. Wyniki uzyskane na zwierzętach zainspirowały badaczy do przeprowadzenia podobnych analiz na mikroflorze jelitowej ludzi. Część wyników obrazuje analogiczne różnice, czyli spadek liczebności *Bacteroidetes* i wzrost liczebności *Firmicutes* w obrębie flory jelitowej osób otyłych. Taki obraz uzyskali m.in. Ley i wsp., którzy przebadali 15 otyłych osób [57]. W innym badaniu, tym razem obejmującym grupę 154 otyłych ochotników, wykazano spadek liczebności *Bacteroidetes* oraz wzrost liczebności *Actinobacteria* [89]. Co więcej, na skutek operacji bariatrycznej (RYGB – zespolenie omijające żołądkowo-jelitowe z pętlą Roux-en-Y), prowadzącej do spadku masy ciała u osób otyłych, badacze zaobserwowali u nich wzrost liczebności *Bacteroidetes*. Im wyższy był stosunek *Bacteroidetes* do *Prevotella*, tym większy był spadek masy tkanki tłuszczowej i poziomu leptyny we krwi. Obserwowane zmiany w mikroflorze jelitowej po RYGB mogą być powiązane z pooperacyjną zmianą pH w obrębie fragmentów przewodu pokarmowego, a jak opisano wcześniej, poziom pH jest bardzo istotnym czynnikiem wpływającym na liczebność i rozmieszczenie bakterii [24,57]. Pojawiają się też wyniki badań, w których nie zaobserwowano spadku liczebności *Bacteroidetes* w obrębie mikroflory jelitowej osób otyłych [32,78].

Murphy i wsp. doszukiwali się przyczyn tak istotnych różnic w wynikach. W przeprowadzonych przez nich badaniach na myszach, zaobserwowali, że różnice te mogą być powiązane m.in. z wiekiem osobników, u których przeprowadza się badania. Według nich nie ma wyraźnej korelacji między składem mikroflory jelitowej a liczbą spożywanych kalorii. Obserwowane przez niektórych badaczy różnice między florą jelitową otyłych i szczupłych osobników są bardziej złożone niż dotychczas uważano [66] i sugerują istnienie wielu innych czynników przyczyniających się do patogenezy otyłości, które jednocześnie wpływają na skład mikroflory jelitowej i utrudniają prawidłową interpretację wyników [44].

Inną różnicą obserwowaną w mikroflorze otyłych osobników jest wzrost liczby bakterii metanogennych, które usuwając szkodliwy nadmiar H_2 ze środowiska, usprawniają procesy fermentacyjne przeprowadzane przez bakterie [87] (ryc. 3). Badania nad *Methanobrevibacter smithii* – głównym przedstawicielem archeonów bytujących w jelicie, wykazały wpływ tego drobnoustroju na usprawnienie procesów fermentacji polisacharydów przeprowadzanych przez bakterie. Wzrost pozyskiwania energii z pożywienia z udziałem bakterii metanogennych może być czynnikiem przyczyniającym się do rozwoju otyłości [76].

MIKROFLORA JELITOWA A CUKRZYCA TYPU 2

Przeprowadza się wiele analiz dotyczących korelacji między składem mikroflory jelitowej a występowaniem cukrzycy typu 2 – T2D (type 2 diabetes). T2D jest chorobą, w której obserwuje się przewlekłą hiperglikemię spowodowaną insulinoopornością tkanek obwodowych i/lub niewystarczającym wytwarzaniem insuliny przez komórki β trzustki. Uważa się, że zarówno insulinooporność jak i dysfunkcja komórek wytwarzających insulinę powstają w wyniku współdziałania wielu czynników środowiskowych i genetycznych. Obserwowany w ciągu ostatnich dziesięcioleci wzrost zachorowań na cukrzycę typu 2 jest wiązany z wieloma elementami współczesnego stylu życia [82].

Wykonano badanie, w którym wzięło udział 30 osób otyłych, wśród których było siedmioro cierpiących na T2D. U chorych na cukrzycę wykazano znaczne zredukowanie liczebności *Faecalibacterium prausnitzii* – bakterii prawidłowo występujących w mikroflorze jelit, należących do typu *Firmicutes*. Badana grupa była zakwalifikowana do operacyjnego leczenia otyłości i po wykonaniu zabiegu, u chorych na T2D liczebność *F. prausnitzii* wzrosła, choć nadal była mniejsza niż u pozostałych badanych. Po operacji zaobserwowano także obniżone stężenia glukozy, insuliny i glikowanej hemoglobiny we krwi badanych oraz mniejszą oporność komórek na insulinę, szacowaną na podstawie wyniku testu HOMA-IR (homeostasis model assessment of insulin resistance). Takie pozytywne wyniki pozwoliły chorym na odstawienie leków przeciwcukrzycowych. Dodatkowo wzrostowi liczebności *F. prausnitzii* towarzyszył spadek markerów stanu zapalnego, tj. białka CRP i IL-6 [42].

Larsen i wsp. przeprowadzili badanie, w którym wzięło udział 36 kobiet, wśród których 18 cierpiało na cukrzycę

typu 2. Kobiety te były w wieku 31–72 lat, a ich BMI wahało się między 23 a 48, czyli były wśród nich zarówno kobiety o prawidłowej masie ciała jak i otyłe. Badacze zaobserwowali zmieniony profil mikroflory jelitowej u chorych na T2D w porównaniu z pozostałymi badanymi. W jelitach pacjentek cierpiących na cukrzycę typu 2 wykazali spadek liczebności *Firmicutes* i *Clostridia*. Dodatkowo zauważono, że stosunek *Bacteroidetes* do *Firmicutes* jest pozytywnie skorelowany ze stężeniem glukozy w osoczu krwi. Stosunek ten nie wykazuje jednak korelacji ze wskaźnikiem masy ciała – BMI. Biorąc pod uwagę, że cukrzyca i upośledzona tolerancja na glukozę często współwystępują z otyłością wyniki te wydają się zastanawiające i wymagają dalszych analiz [51].

Stosunek *Bacteroidetes* do *Firmicutes*, czyli bakterii Gram-ujemnych do Gram-dodatnich, u osób, które cierpią jednocześnie na otyłość i cukrzycę typu 2 nie jest w pełni jednoznaczny, ale wykazano dodatni związek między zawartością LPS – lipopolisacharydu (lipopolysaccharide) w osoczu krwi myszy, a przyrostem masy ciała, akumulacją trójglicerydów, insulinoopornością oraz cukrzycą typu 2. LPS jest wysoce prozapalnym elementem ściany komórkowej bakterii Gram-ujemnych, wchodzących w skład mikroflory jelitowej i może brać udział w rozwoju stanu zapalnego, towarzyszącego cukrzycy typu 2. Dożylne podawanie lipopolisacharydu myszom wywołuje u nich insulinooporność oraz otyłość [14]. Potwierdzeniem wyników badań na zwierzętach, były analizy poziomu LPS w osoczu ludzi zdrowych i cierpiących na T2D. Analogicznie wykazano wyższy poziom lipopolisacharydu u chorych na cukrzycę niż u osób zdrowych. Istnienie tej korelacji może sugerować, że LPS bierze udział w patogenezie cukrzycy typu 2 [24]. Traktowanie szczurów polimiksyną B – antybiotykiem, którego działanie skupia się na bakteriach Gram-ujemnych, powoduje spadek zawartości LPS w osoczu krwi, zmniejsza częstość występowania stłuszczeniowego zapalenia wątroby oraz innych wyżej wymienionych schorzeń [72].

ZWIĄZEK MIĘDZY MIKROFLORĄ JELITOWĄ A CUKRZYCĄ TYPU 1

Cukrzyca typu 1 – T1D (type 1 diabetes) jest chorobą, w przebiegu której dochodzi do uszkodzenia odpowiadających za wytwarzanie insuliny komórek β trzustki. T1D może mieć podłoże genetyczne lub wystąpić np. jako powikłanie po infekcji wirusowej czy też być skutkiem przyjmowania niektórych leków. Częstość występowania cukrzycy typu 1 wśród dzieci i młodzieży krajów zachodnich, podobnie jak w przypadku T2D, znacząco wzrosła w ostatnich dziesięcioleciach. Naukowcy, doszukując się przyczyn tego zjawiska, jako jeden z kierunków badań obrali mikroflorę jelitową. Zauważono jej zmieniony skład u chorych na cukrzycę typu 1 w porównaniu z mikroflorą zdrowych badanych. Interesujące jest to, że zmiany te można wykryć długo przed pojawieniem się klinicznych objawów choroby. Przeprowadzono badania, które sugerują, że mikroflora jelitowa i jej interakcje z układem odpornościowym są ważnymi czynnikami wpływającymi na predyspozycje do występowania cukrzycy typu 1. Naukowcy testowali udział TLRs (Toll-like receptors), białka MyD88 oraz mikroflory jelitowej w mysim modelu T1D (non-obese diabetic).

U myszy tych komórki β trzustki wytwarzające insulinę są atakowane i niszczone przez aktywowane komórki układu immunologicznego. TLRs są głównymi składnikami wrodzonego układu odpornościowego, które wykrywają infekcje bakteryjne i inicjują przeciwbakteryjną odpowiedź immunologiczną, a białko MyD88 wykorzystywane jest przez TLRs podczas odpowiedzi immunologicznej organizmu. Wykazano, że w mysim modelu T1D pozbawionym białka MyD88 nie dochodzi do rozwoju cukrzycy typu 1. Jest to związane najprawdopodobniej z mikroflorą jelitową, bo jeżeli myszy te będą wolne od mikroflory towarzyszącej („germ-free”) i także pozbawimy je białka MyD88, to zaobserwujemy objawy T1D. Co ciekawe, po skolonizowaniu jelit tych myszy kilkoma grupami bakterii wchodzących w skład ludzkiej mikroflory jelitowej dochodzi do stłumienia objawów cukrzycy typu 1. Wykazano ponadto, że pozbawienie białka MyD88 zmienia skład mikroflory jelitowej. Przeniesienie mikroflory z jelit mysiego modelu T1D pozbawionego MyD88 (niezapadających na T1D) do takich samych myszy, ale „germ-free”, czyli chorujących na cukrzycę, powoduje u nich osłabienie objawów T1D. Wszystkie te wyniki wskazują, że interakcje mikroflory jelitowej ze składnikami wrodzonego układu odpornościowego mogą być głównym czynnikiem wpływającym na predyspozycje do rozwoju cukrzycy typu 1 [95].

WPEŁY MIKROFLORY JELITOWEJ NA UKŁAD IMMUNOLOGICZNY

Biorąc pod uwagę powierzchnię wchłaniania jelita cienkiego, która wynosi około 100 m², narażenie układu pokarmowego na antygeny środowiskowe i czynniki patogenne jest bardzo duże. Prawidłowa mikroflora przewodu pokarmowego, jak wspomniano wcześniej, jest jedną z ważniejszych barier chroniących przed zakażeniem mikroorganizmami patogennymi. Ponadto nasz organizm wykształcił wiele nieswoistych i swoistych mechanizmów broniących błony śluzowe układu pokarmowego przed zagrożeniem z zewnątrz. Najbardziej charakterystyczne cząsteczki drobnoustrojów, selektywnie rozpoznawane przez komórki odpowiedzi nieswoistej, określane są jako wzorce molekularne związane z patogenami – PAMP (patogen associated molecular patterns). Receptory dla cząsteczek PAMP nazywane są receptorami rozpoznającymi wzorce – PRR (pattern recognition receptors). Wyróżnia się dwie główne grupy PRRs: cytoplazmatyczne NLRs (Nod-like receptors) oraz wspomniane we wcześniejszym rozdziale, błonowe receptory TLRs (Toll-like receptors). Poziom LPS, będącego przykładem PAMP, jest stale monitorowany z udziałem TLR4 [46]. U szczurów podatnych na wystąpienie otyłości obserwowano zwiększoną przepuszczalność jelit oraz podwyższony poziom LPS we krwi [26]. Zwiększoną przepuszczalność jelit stwierdzono też u myszy karmionych dietą wysokotłuszczową [15]. Reasumując, podwyższony poziom PAMP i aktywacja PRRs prowadzą do indukcji stanu zapalnego, a to z kolei wiąże się z rozwojem zaburzeń metabolicznych, takich jak oporność tkanek na insulinę czy choroby układu sercowo-naczyniowego [46].

Hipotezę o związku między układem immunologicznym, mikroflorą jelitową a insulinoopornością potwierdzają

badania przeprowadzone u myszy pozbawionych TLR5. Okazuje się, że zmiana różnorodności w obrębie mikroflory jelitowej tych osobników powiązana jest ze spadkiem wrażliwości komórek ich organizmu na insulinę, hiperinsulinemią oraz otyłością, a w efekcie wystąpieniem zespołu metabolicznego. Przeniesienie mikroflory jelitowej myszy pozbawionych TLR5 do myszy „germ-free” także skutkowało powstawaniem nieprawidłowości metabolicznych u tych osobników. Co ciekawe, jeśli w 3 tygodniu życia myszom pozbawionym TLR5 ograniczono przyjmowanie kalorii to restrykcje te zapobiegały rozwojowi otyłości, ale nie miały wpływu na rozwój insulinooporności [92].

ZMIANY W EKOSYSTEMIE JELIT JAKO ELEMENT TERAPII

Najlepszą, niechirurgiczną i niefarmakologiczną metodą leczenia otyłości i zapobiegania cukrzycy typu 2 jest wprowadzenie trwałych zmian w diecie oraz zwiększenie aktywności fizycznej, w celu zniwelowania dodatniego bilansu energetycznego w organizmie. Mimo że dokładna rola mikroorganizmów wchodzących w skład mikroflory jelitowej nie jest całkowicie poznana, to zgromadzone dotychczas wyniki pozwalają na rozpoczęcie badań mających na celu wprowadzanie zmian w obrębie ekosystemu jelit i wykorzystaniu ich jako elementu terapii [73]. Stosowanie leków przeciwbakteryjnych, prebiotyków i probiotyków może skutkować zmianami w składzie mikroflory jelitowej i przynajmniej częściowo pozwolić na zapobieganie lub leczenie chorób metabolicznych [29].

Leki przeciwbakteryjne

Wykazano, że leczenie przeciwbakteryjne zmniejsza zachorowalność i opóźnia wystąpienie cukrzycy typu 1. Brugman i wsp. przeprowadzili badanie na szczurzych modelach T1D – BB-DP (Bio-breeding diabetes prone). W pierwszym etapie doświadczenia badacze przeanalizowali skład mikroflory jelitowej szczurów na długo przed wystąpieniem klinicznych objawów cukrzycy typu 1. Zaobserwowano różnice w składzie mikroflory jelitowej między szczurami, które finalnie zachorowały na cukrzycę typu 1 oraz tymi, u których nie doszło do rozwoju choroby. Mikroflora jelitowa szczurów, które nie zachorowały na T1D charakteryzowała się obniżoną zawartością bakterii należących *Bacteroidetes*. Następnie badacze analizowali wpływ antybiotykoterapii na częstość występowania cukrzycy typu 1. Podawanie antybiotyków szczurom BB-DP prowadziło do zmian w ich mikroflorze jelitowej oraz zmniejszało częstość występowania T1D lub opóźniało pojawienie się jej objawów. Uzyskane wyniki sugerują, że mikroflora jelitowa może brać udział w patogenezie cukrzycy typu 1. Co więcej, czynniki, które mogą modyfikować skład flory jelit, np. analizowane antybiotyki, mogą się stać elementem interwencji terapeutycznej [12]. Także w przypadku cukrzycy typu 2 (myszy *ob/ob*) podawanie antybiotyków (norfloksacyliny i ampicyliny) prowadziło do znacznej poprawy tolerancji glukozy. U zwierząt tych obserwowano: obniżony poziom trójglicerydów w wątrobie oraz LPS we krwi, a także zwiększoną ilość glikogenu w wątrobie oraz adiponektyny we krwi [65].

Prebiotyki

Prebiotyki to nieulegające trawieniu związki chemiczne, głównie oligosacharydy, które są pokarmem bakterii zasiedlających jelita. Przyspieszają one wzrost pożytecznych grup organizmów komensalnych, takich jak np. *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*. Fruktooligosacharydy, do których zalicza się m.in. inulina i oligofruktoza, nie mogą ulec strawieniu w górnym odcinku przewodu pokarmowego, ale mogą być metabolizowane przez pewne grupy drobnoustrojów wchodzących w skład mikroflory jelitowej. Związki te uczestniczą w modulacji wzrostu innych pożytecznych drobnoustrojów bytujących w jelicie grubym. Fruktooligosacharydy pełnią zatem rolę prebiotyków [75]. Przeprowadzono badania pod kątem wpływu oligofruktozy na ilość uzyskiwanej energii z pożywienia oraz przyrost masy ciała i tkanki tłuszczowej. Badania prowadzono na dwóch grupach szczurów, jedne z nich żywiono standardową dietą, o średniej zawartości tłuszczu [19] zaś drugie dietą wysokotłuszczową [21]. Wykazano, że dodanie oligofruktozy zwiększa poziom wydzielanej insuliny, obniża stężenie glukozy we krwi, zmniejsza ilość uzyskiwanej energii z pożywienia oraz ogranicza przyrost masy ciała i tkanki tłuszczowej u obu badanych grup. Należy zaznaczyć, że było to osiągnięte dzięki zwiększonemu stężeniu inkretyn – hormonów jelitowych, które wpływają na poposiłkowe wydzielanie insuliny przez komórki β wysp trzustkowych, a więc w sposób pośredni biorą udział w regulacji łaknienia i masy ciała [27,93].

W innym badaniu wykazano także, że u otrzymujących oligofruktozę myszy, żywionych wysokotłuszczową dietą, występuje dodatnia korelacja między kolonizacją *Bifidobacterium* a lepszą tolerancją glukozy, wydzielaniem insuliny pod wpływem zwiększonego stężenia glukozy oraz normalizacja stężenia czynników prozapalnych [20].

Kolejne dowody wpływu prebiotyków na redukcję wchłaniania tłuszczu przyniosły badania z udziałem ludzi. Ochotnicy biorący udział w badaniu byli podzieleni na dwie grupy. Jedna dostawała pokarm o wysokiej zawartości tłuszczu, a druga żywiona była beztłuszczowym pożywieniem z dodatkiem inuliny, błonnika pozyskanego z pestek łubinu oraz nieulegającej trawieniu skrobi. Zaobserwowano redukcję wchłaniania tłuszczu u osób, które spożywały pokarm z dodatkiem prebiotyków [3]. W innym badaniu z udziałem 10 zdrowych ochotników o prawidłowej masie ciała, czternastodniowe przyjmowanie oligofruktozy spowodowało przyspieszone występowanie uczucia sytości po śniadaniu i kolacji oraz znacząco osłabiło uczucie głodu. Wydłużyło także czas między posiłkami, co doprowadziło do zmniejszenia przyjmowanej dziennej porcji energii o 5% w stosunku do badanej grupy kontrolnej [18].

Takie obserwacje wydają się przeczyć wynikom innych badań sugerujących, że nieulegające trawieniu polisacharydy mogą w pewien sposób odpowiadać za przyrost masy ciała u badanych myszy przez zwiększone pozyskiwanie kalorii z trawionego pożywienia [87]. Te różnice mogą jednak wynikać z wielu czynników. Jednym z nich jest swoisty

osobniczo skład mikroflory jelitowej, która do tej pory została zidentyfikowana jedynie w części [49].

Opisane wyżej zależności i obserwacje wydają się sugerować ważną rolę suplementacji prebiotykami i stanowią podstawę do dalszych badań nad zastosowaniem tych związków do modyfikacji mikroflory jelitowej, a w efekcie pomoc w leczeniu osób otyłych, z nadwagą oraz cukrzycą typu 2 [29].

Probiotyki

Probiotyki to niepatogenne mikroorganizmy, które po spożyciu przynoszą korzyści zdrowotne organizmowi gospodarza [77]. W ostatnich latach stały się one obiektem ogromnego zainteresowania wielu badaczy z powodu zaskakująco pozytywnych wyników nad ich zastosowaniem w leczeniu biegunek oraz innych stanów chorobowych [40].

Podjęto także wiele badań prowadzących do wykorzystania probiotyków w leczeniu otyłości. Na myszach z otyłością indukowaną dietą przebadano działanie *Lactobacillus rhamnosus*, bakterii bytującej w jelicie ludzkim i wytwarzającej kwas linolowy. Zaobserwowano pozytywny wpływ wytwarzanego przez *L. rhamnosus* kwasu linolowego na redukcję tkanki tłuszczowej. Po 8 tygodniach doustnego stosowania probiotyku zawierającego *L. rhamnosus*, zaobserwowano redukcję masy ciała u badanych zwierząt, przy niezmienionej ilości spożywanych kalorii. Dalsze badania wskazały, że jest to związane z apoptozą komórek w obrębie tkanki tłuszczowej [53].

W celu potwierdzenia pozytywnego działania kwasu linolowego wytwarzanego przez opisany wyżej probiotyk przeprowadzono kolejne badanie, tym razem na ludziach, podczas którego ponad 100 badanych otrzymywało przez rok 3,4 g kwasu linolowego dziennie. Grupa kontrolna otrzymywała placebo. Wyniki badań nie były jednak analogiczne do przeprowadzonych na zwierzętach i nie wykazały pozytywnego wpływu metabolitu wytwarzanego przez *L. rhamnosus* na redukcję masy ciała i tkanki tłuszczowej u ludzi [52].

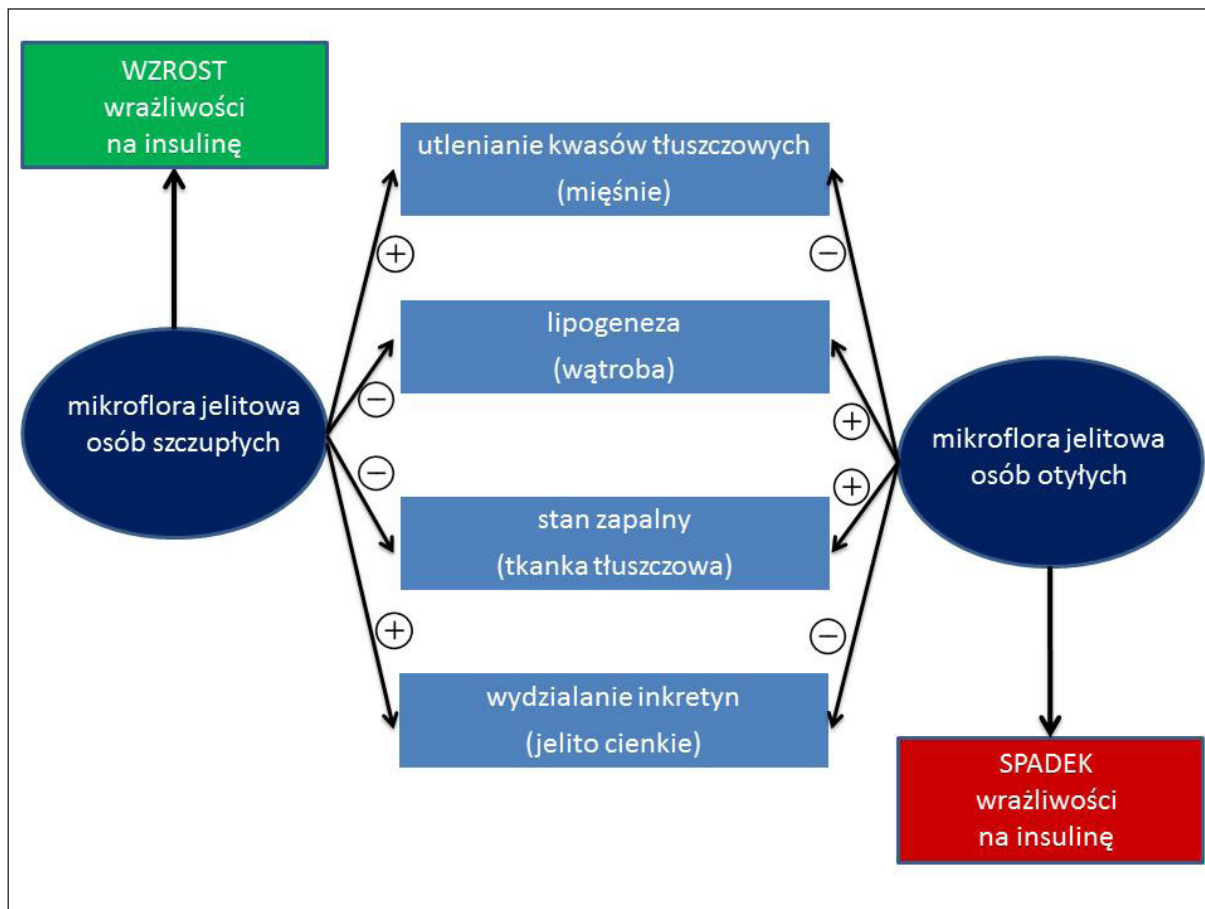
Kolejne badania polegały na skolonizowaniu myszy „germ-free” powszechnie stosowanymi probiotykami – *Bacillus thetaiotaomicron* i *Bifidobacterium longum*. Zauważono, że gdy *B. thetaiotaomicron* współwystępuje z *B. longum*, zwiększa się ilość trawionych przez te drobnoustroje polisacharydów i dzieje się tak niezależnie od genotypu gospodarza. Analogiczny efekt zaobserwowano po zastosowaniu innego probiotyku – *Lactobacillus casei* [81]. W innym badaniu myszom „germ-free” skolonizowanym ludzką mikroflorą jelitową podawano napoje zawierające probiotyki. Zaobserwowano, że podanie ich powoduje znaczne zmiany w obrębie mikroflory jelitowej oraz związane z tym zmiany metabolizmu w obrębie różnych tkanek. Zaobserwowano m.in. zmieniony profil metabolizmu lipidów w wątrobie, skutkujący obniżonym poziomem lipoprotein w osoczu oraz nasilenie procesu glikolizy [63].

Znaczenie wyżej opisanych odkryć dla homeostazy energetycznej organizmu i zdrowia człowieka nie jest na razie całkowicie poznane i wytłumaczone. Wyniki sugerują jednak, że probiotyki i prebiotyki mogą wpływać na dynamikę mikroflory jelitowej jako całości. Wykazują też, że metody biologii molekularnej mogą być z powodzeniem wykorzystywane w celu oceny wpływu probiotyków i prebiotyków na metabolizm gospodarza i skład jego mikroflory jelitowej, a w efekcie na możliwość wykorzystania ich w leczeniu cukrzycy i otyłości [29].

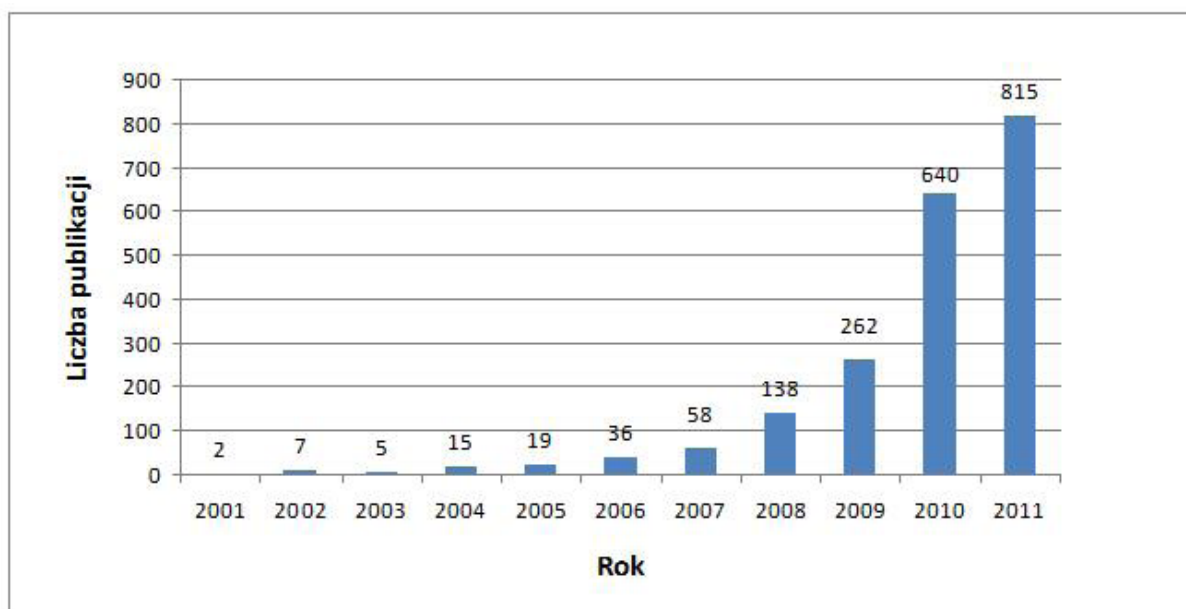
UWAGI KOŃCOWE

Stajemy obecnie w obliczu ery, która umożliwi nam lepsze zrozumienie funkcji mikroflory jelitowej, nazywanej przez badaczy „nowym organem w obrębie ludzkiego organizmu”. Okres ten, pełen obaw związanych ze światową „epidemią” otyłości i cukrzycy typu 2, każe zwiększać wysiłki w celu zidentyfikowania i modyfikowania czynników wpływających na równowagę energetyczną organizmu [13]. Niewątpliwie skład mikroflory jelitowej znacząco różni się między osobnikami otyłymi i zdrowymi. Dodatkowo skład flory jelit uwarunkowany jest nie tylko genetycznie, ale także ma ścisły związek z wieloma czynnikami środowiskowymi [84]. Nie jest jednak pewne, czy zmiany w składzie mikroflory jelitowej są przyczyną czy skutkiem otyłości [91]. Symbioza człowieka z mikroorganizmami dostarcza obu stronom znaczących korzyści, a oddziaływanie mikroflory jelitowej na organizm gospodarza zachodzi na wielu płaszczyznach. U osób zdrowych mikroflora jelitowa ma głównie pozytywny wpływ na metabolizm gospodarza. Problem rozpoczyna się wraz z rozwijaniem się stanów patologicznych, takich jak otyłość, czy cukrzyca typu 2. Wówczas obserwuje się niekorzystne zmiany w oddziaływaniach na płaszczyźnie organizm gospodarza – jego mikroflora jelitowa (ryc. 5). Nie wiadomo jednak dlaczego tak się dzieje i jak temu zapobiec.

Obecnie trwają intensywne badania nie tylko pod kątem mikroflory jelitowej, ale także całej mikroflory zasiedlającej ludzki organizm. Dowodem jest powstanie Human Microbiome Project (HMP). Jest to międzynarodowy projekt zajmujący się charakterystyką mikroorganizmów znajdujących się w obrębie różnych obszarów ludzkiego ciała. Dotyczy on nie tylko poruszanej w pracy mikroflory przewodu pokarmowego, ale także tej, znajdującej się w obrębie przewodów nosowych, jamy ustnej, bytującej na skórze czy też zasiedlającej układ moczowo-płciowy. Celem badań jest zarówno scharakteryzowanie i poznanie roli tych drobnoustrojów, jak również wykazanie ich potencjalnego wpływu na patogenzę wielu chorób. W oparciu o wyniki badań HMP, na coraz szerszą skalę, wdraża się terapie i leki, m.in. opisane w pracy probiotyki i prebiotyki. Temat „human microbiome” jest bardzo ciekawy i rozwojowy, o czym świadczy liczba publikacji pojawiających się w przeciągu ostatnich 10 lat (ryc. 6).



Ryc. 5. Różnice w oddziaływaniu mikroflory jelitowej na organizm gospodarza u osób szczupłych i otyłych



Ryc. 6. Liczba publikacji na temat „human microbiome” w latach 2001-2011 (wyszukiwanie dla „All Fields” w bazie PubMed)

PIŚMIENNICTWO

- [1] Agans R., Rigsbee L., Kenche H., Michail S., Khamis H.J., Paliy O.: Distal gut microbiota of adolescent children is different from that of adults. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 2011; 77: 404-412
- [2] Angelakis E., Armougom F., Million M., Raoult D.: The relationship between gut microbiota and weight gain in humans. *Future Microbiol.*, 2012; 7: 91-109
- [3] Archer B.J., Johnson S.K., Devereux H.M., Baxter A.L.: Effect of fat replacement by inulin or lupin-kernel fibre on sausage patty acceptability, post-meal perceptions of satiety and food intake in men. *Brit. J. Nutr.*, 2004; 91: 591-599
- [4] Arumugam M., Raes J., Pelletier E., Le Paslier D., Yamada T., Mende D.R., Fernandes G.R., Tap J., Bruls T., Batto J.M., Bertalan M., Borruel N., Casellas F., Fernandez L., Gautier L., Hansen T., Hattori M., Hayashi T., Kleerebezem M., Kurokawa K., Leclerc M., Levenez F., Manichanh C., Nielsen H.B., Nielsen T., Pons N., Poulain J., Qin J., Sichert-Ponten T., Tims S., Torrents D., Ugarte E., Zoetendal E.G., Wang J., Guarner F., Pedersen O., de Vos W.M., Brunak S., Doré J.; MetaHIT Consortium, Antolín M., Artiguenave F., Blottiere H.M., Almeida M., Brechot C., Cara C., Chervaux C., Cultrone A., Delorme C., Denariac G., Dervyn R., Foerstner K.U., Friss C., van de Guchte M., Guedon E., Haimet F., Huber W., van Hylckama-Vlieg J., Jamet A., Juste C., Kaci G., Knol J., Lakhdari O., Layec S., Le Roux K., Maguin E., Mérieux A., Melo Minardi R., M'rimi C., Müller J., Oozeer R., Parkhill J., Renault P., Rescigno M., Sanchez N., Sunagawa S., Torrejon A., Turner K., Vandemeulebrouck G., Varela E., Winogradsky Y., Zeller G., Weissenbach J., Ehrlich S.D., Bork P.: Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 2011; 473: 174-180
- [5] Bäckhed F., Crawford P.A., O'Donnell D., Gordon J.I.: Postnatal lymphatic partitioning from the blood vasculature in the small intestine requires fasting-induced adipose factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007; 104: 606-611
- [6] Bäckhed F., Ding H., Wang T., Hooper L.V., Koh G.Y., Nagy A., Semenkovich C.F., Gordon J.I.: The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004; 101: 15718-15723
- [7] Barbara G., Stanghellini V., Brandi G., Cremon C., Di Nardo G., De Giorgio R., Corinaldesi R.: Interactions between commensal bacteria and gut sensorimotor function in health and disease. *Am. J. Gastroenterol.*, 2005; 100: 2560-2568
- [8] Baxter J.D., Webb P.: Metabolism: bile acids heat things up. *Nature*, 2006; 439: 402-403
- [9] Benson A.K., Kelly S.A., Legge R., Ma F., Low S.J., Kim J., Zhang M., Oh P.L., Nehrenberg D., Hua K., Kachman S.D., Moriyama E.N., Walter J., Peterson D.A., Pomp D.: Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010; 107: 18933-18938
- [10] Bjursell M., Admyre T., Göransson M., Marley A.E., Smith D.M., Oscarsson J., Bohlooly Y.M.: Improved glucose control and reduced body fat mass in free fatty acid receptor 2-deficient mice fed a high-fat diet. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2011; 300: E211-E220
- [11] Brown A.J., Goldsworthy S.M., Barnes A.A., Eilert M.M., Tchang L., Daniels D., Muir A.I., Wigglesworth M.J., Kinghorn I., Fraser N.J., Pike N.B., Strum J.C., Steplewski K.M., Murdock P.R., Holder J.C., Marshall F.H., Szekeres P.G., Wilson S., Ignar D.M., Foord S.M., Wise A., Dowell S.J.: The Orphan G protein-coupled receptors GPR41 and GPR43 are activated by propionate and other short chain carboxylic acids. *J. Biol. Chem.*, 2003; 278: 11312-11319
- [12] Brugman S., Klatter F.A., Visser J.T., Wildeboer-Veloo A.C., Harmen H.J., Rozing J., Bos N.A.: Antibiotic treatment partially protects against type 1 diabetes in the Bio-Breeding diabetes prone rat. Is the gut flora involved in the development of type 1 diabetes? *Diabetologia*, 2006; 49: 2105-2108
- [13] Burcelin R., Serino M., Chabo C., Blasco-Baque V., Amar J.: Gut microbiota and diabetes: from pathogenesis to therapeutic perspective. *Acta Diabetol.*, 2011; 48: 257-273
- [14] Cani P.D., Amar J., Iglesias M.A., Poggi M., Knauf C., Bastelica D., Neyrinck A.M., Fava F., Tuohy K.M., Chabo C., Waget A., Delmée E., Cousin B., Sulpice T., Chamontin B., Ferrières J., Tanti J.F., Gibson G.R., Casteilla L., Delzenne N.M., Alessi M.C., Burcelin R.: Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*, 2007; 56: 1761-1772
- [15] Cani P.D., Bibiloni R., Knauf C., Waget A., Neyrinck A.M., Delzenne N.M., Burcelin R.: Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes*, 2008; 57: 1470-1481
- [16] Cani P.D., Delzenne N.M.: Interplay between obesity and associated metabolic disorders: new insights into the gut microbiota. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2009; 9: 737-743
- [17] Cani P.D., Delzenne N.M.: The gut microbiome as therapeutic target. *Pharmacol. Ther.*, 2011; 130: 202-212
- [18] Cani P.D., Joly E., Horsmans Y., Delzenne N.M.: Oligofructose promotes satiety in healthy human: a pilot study. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 2006; 60: 567-72
- [19] Cani P.D., Montoya M.L., Neyrinck A.M., Delzenne N.M., Lambert D.M.: Potential modulation of plasma ghrelin and glucagon-like peptide-1 by anorexigenic cannabinoid compounds, SR141716A (rimonabant) and oleoylethanolamide. *Br. J. Nutr.*, 2004; 92: 757-761
- [20] Cani P.D., Neyrinck A.M., Fava F., Knauf C., Burcelin R.G., Tuohy K.M., Gibson G.R., Delzenne N.M.: Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia*, 2007; 50: 2374-2383
- [21] Cani P.D., Neyrinck A.M., Maton N., Delzenne N.M.: Oligofructose promotes satiety in rats fed a high-fat diet: involvement of glucagon-like Peptide-1. *Obes. Res.*, 2005; 13: 1000-1007
- [22] Chan R.S., Woo J.: Prevention of overweight and obesity: how effective is a current public health approach. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2010; 7: 765-783
- [23] Claesson M.J., Cusack S., O'Sullivan O., Greene-Diniz R., de Weerd H., Flannery E., Marchesi J.R., Falush D., Dinan T., Fitzgerald G., Stanton C., van Sinderen D., O'Connor M., Harnedy N., O'Connor K., Henry C., O'Mahony D., Fitzgerald A.P., Shanahan F., Twomey C., Hill C., Ross R.P., O'Toole P.W.: Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011; 108 (Suppl. 1): 4586-4591
- [24] Creely S.J., McTernan P.G., Kusminski C.M., Fisher M., Da Silva N.F., Khanolkar M., Evans M., Harte A.L., Kumar S.: Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2007; 292: E740-E747
- [25] De Filippo C., Cavalieri D., Di Paola M., Ramazzotti M., Poullet J.B., Massart S., Collini S., Pieraccini G., Lionetti P.: Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010; 107: 14691-14696
- [26] de La Serre C.B., Ellis C.L., Lee J., Hartman A.L., Rutledge J.C., Raybould H.E.: Propensity to high-fat diet-induced obesity in rats is associated with changes in the gut microbiota and gut inflammation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2010; 299: G440-G448
- [27] Delzenne N.M., Cani P.D., Daubioul C., Neyrinck A.M.: Impact of inulin and oligofructose on gastrointestinal peptides. *Br. J. Nutr.*, 2005; 93 (Suppl. 1): S157-S161
- [28] Denechaud P.D., Dentin R., Girard J., Postic C.: Role of ChREBP in hepatic steatosis and insulin resistance. *FEBS Lett.*, 2008; 582: 68-73

- [29] DiBaise J.K., Zhang H., Crowell M.D., Krajmalnik-Brown R., Decker G.A., Rittmann B.E.: Gut microbiota and its possible relationship with obesity. *Mayo Clin. Proc.*, 2008; 83: 460-469
- [30] Dumas M.E., Barton R.H., Toye A., Cloarec O., Blancher C., Rothwell A., Fearnside J., Tatoud R., Blanc V., Lindon J.C., Mitchell S.C., Holmes E., McCarthy M.I., Scott J., Gauguier D., Nicholson J.K.: Metabolic profiling reveals a contribution of gut microbiota to fatty liver phenotype in insulin-resistant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006; 103: 12511-12516
- [31] Duncan S.H., Belongue A., Holtrop G., Johnstone A.M., Flint H.J., Lobley G.E.: Reduced dietary intake of carbohydrates by obese subjects results in decreased concentrations of butyrate and butyrate-producing bacteria in feces. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007; 73: 1073-1078
- [32] Duncan S.H., Lobley G.E., Holtrop G., Ince J., Johnstone A.M., Louis P., Flint H.J.: Human colonic microbiota associated with diet, obesity and weight loss. *Int. J. Obes.*, 2008; 32: 1720-1724
- [33] Eckburg P.B., Bik E.M., Bernstein C.N., Purdom E., Dethlefsen L., Sargent M., Gill S.R., Nelson K.E., Relman D.A.: Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 2005; 308: 1635-1638
- [34] Enck P., Zimmermann K., Rusch K., Schwartz A., Klosterhalfen S., Frick J.S.: The effects of maturation on the colonic microflora in infancy and childhood. *Gastroenterol. Res. Pract.*, 2009; 2009: 752401
- [35] Fallani M., Amarri S., Uusijarvi A., Adam R., Khanna S., Aguilera M., Gil A., Vieites J.M., Norin E., Young D., Scott J.A., Doré J., Edwards C.A.: INFABIO team: Determinants of the human infant intestinal microbiota after the introduction of first complementary foods in infant samples from five European centres. *Microbiology*, 2011; 157: 1385-1392
- [36] Farooqi I.S., Bullmore E., Keogh J., Gillard J., O'Rahilly S., Fletcher P.C.: Leptin regulates striatal regions and human eating behavior. *Science*, 2007; 317: 1355
- [37] Favier C.F., de Vos W.M., Akkermans A.D.: Development of bacterial and bifidobacterial communities in feces of newborn babies. *Anaerobe*, 2003; 9: 219-229
- [38] Favier C.F., Vaughan E.E., De Vos W.M., Akkermans A.D.: Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002; 68: 219-226
- [39] Flint H.J., Bayer E.A., Rincon M.T., Lamed R., White B.A.: Polysaccharide utilization by gut bacteria: potential for new insights from genomic analysis. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2008; 6: 121-131
- [40] Floch M.H., Montrose D.C.: Use of probiotics in humans: an analysis of the literature. *Gastroenterol. Clin. North Am.*, 2005; 34: 547-570
- [41] Frank D.N., St Amand A.L., Feldman R.A., Boedeker E.C., Harpaz N., Pace N.R.: Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007; 104: 13780-13785
- [42] Furet J.P., Kong L.C., Tap J., Poitou C., Basdevant A., Bouillot J.L., Mariat D., Corthier G., Doré J., Henegar C., Rizkalla S., Clément K.: Differential adaptation of human gut microbiota to bariatric surgery-induced weight loss: links with metabolic and low-grade inflammation markers. *Diabetes*, 2010; 59: 3049-3057
- [43] Gao Z., Yin J., Zhang J., Ward R.E., Martin R.J., Lefevre M., Cefalu W.T., Ye J.: Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice. *Diabetes*, 2009; 58: 1509-1517
- [44] Greiner T., Bäckhed F.: Effects of the gut microbiota on obesity and glucose homeostasis. *Trends Endocrinol. Metab.*, 2011; 22: 117-123
- [45] Grudell A.B., Camilleri M.: The role of peptide YY in integrative gut physiology and potential role in obesity. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.*, 2007; 14: 52-57
- [46] Harris K., Kassis A., Major G., Chou C.J.: Is the gut microbiota a new factor contributing to obesity and its metabolic disorders? *J. Obes.*, 2012; 2012: 879151
- [47] Hildebrandt M.A., Hoffmann C., Sherrill-Mix S.A., Keilbaugh S.A., Hamady M., Chen Y.Y., Knight R., Ahima R.S., Bushman F., Wu G.D.: High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity. *Gastroenterology*, 2009; 137: 1716-1724
- [48] Kahn B.B., Alquier T., Carling D., Hardie D.G.: AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab.*, 2005; 1: 15-25
- [49] Kleessen B., Hartmann L., Blaut M.: Oligofructose and long-chain inulin: influence on the gut microbial ecology of rats associated with a human faecal flora. *Br. J. Nutr.*, 2001; 86: 291-300
- [50] Kootte R.S., Vrieze A., Holleman F., Dallinga-Thie G.M., Zoetendal E.G., de Vos W.M., Groen A.K., Hoekstra J.B., Stoes E.S., Nieuwdorp M.: The therapeutic potential of manipulating gut microbiota in obesity and type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Obes. Metab.*, 2012; 14: 112-120
- [51] Larsen N., Vogensen F.K., van den Berg F.W., Nielsen D.S., Andreassen A.S., Pedersen B.K., Al-Soud W.A., Sørensen S.J., Hansen L.H., Jakobsen M.: Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS One*, 2010; 5: e9085
- [52] Larsen T.M., Toubro S., Gudmundsen O., Astrup A.: Conjugated linoleic acid supplementation for 1 y does not prevent weight or body fat regain. *Am. J. Clin. Nutr.*: 2006; 83: 606-612
- [53] Lee H.Y., Park J.H., Seok S.H., Baek M.W., Kim D.J., Lee K.E., Paek K.S., Lee Y., Park J.H.: Human originated bacteria, *Lactobacillus rhamnosus* PL60, produce conjugated linoleic acid and show anti-obesity effects in diet-induced obese mice. *Biochim. Biophys. Acta*, 2006; 1761: 736-744
- [54] Lefebvre P., Cariou B., Lien F., Kuipers F., Staels B.: Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol. Rev.*, 2009; 89: 147-191
- [55] Ley R.E., Bäckhed F., Turnbaugh P., Lozupone C.A., Knight R.D., Gordon J.I.: Obesity alters gut microbial ecology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005; 102: 11070-11075
- [56] Ley R.E., Peterson D.A., Gordon J.I.: Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*, 2006; 124: 837-848
- [57] Ley R.E., Turnbaugh P.J., Klein S., Gordon J.I.: Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 2006; 444: 1022-1023
- [58] Li M., Wang B., Zhang M., Rantalainen M., Wang S., Zhou H., Zhang Y., Shen J., Pang X., Zhang M., Wei H., Chen Y., Lu H., Zuo J., Su M., Qiu Y., Jia W., Xiao C., Smith L.M., Yang S., Holmes E., Tang H., Zhao G., Nicholson J.K., Li L., Zhao L.: Symbiotic gut microbes modulate human metabolic phenotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008; 105: 2117-2122
- [59] Liszt K., Zwieler J., Handschur M., Hippe B., Thaler R., Haslberger A.G.: Characterization of bacteria, clostridia and Bacteroides in faeces of vegetarians using qPCR and PCR-DGGE fingerprinting. *Ann. Nutr. Metab.*, 2009; 54: 253-257
- [60] Ludwig W., Schleifer K.H.: Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiol. Rev.*, 1994; 15: 155-173
- [61] Macfarlane S., Macfarlane G.T.: Bacterial diversity in the human gut. *Adv. Appl. Microbiol.*, 2004; 54: 261-289
- [62] Marchesi J., Shanahan F.: The normal intestinal microbiota. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 2007; 20: 508-513
- [63] Martin F.P., Wang Y., Sprenger N., Yap I.K., Lundstedt T., Lek P., Rezzi S., Ramadan Z., van Bladeren P., Fay L.B., Kochhar S., Lindon J.C., Holmes E., Nicholson J.K.: Probiotic modulation of symbiotic gut

- microbial-host metabolic interactions in a humanized microbiome mouse model. *Mol. Syst. Biol.*, 2008; 4: 157
- [64] Maslowski K.M., Vieira A.T., Ng A., Kranich J., Sierro F., Yu D., Schilter H.C., Rolph M.S., Mackay F., Artis D., Xavier R.J., Teixeira M.M., Mackay C.R.: Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature*, 2009; 461: 1282-1286
- [65] Membrez M., Blancher F., Jaquet M., Bibiloni R., Cani P.D., Burcelin R.G., Corthesy I., Macé K., Chou C.J.: Gut microbiota modulation with norfloxacin and ampicillin enhances glucose tolerance in mice. *FASEB J.*, 2008; 22: 2416-2426
- [66] Murphy E.F., Cotter P.D., Healy S., Marques T.M., O'Sullivan O., Fouhy F., Clarke S.F., O'Toole P.W., Quigley E.M., Stanton C., Ross P.R., O'Doherty R.M., Shanahan F.: Composition and energy harvesting capacity of the gut microbiota: relationship to diet, obesity and time in mouse models. *Gut*, 2010; 59: 1635-1642
- [67] Neu J., Douglas-Escobar M., Lopez M.: Microbes and the developing gastrointestinal tract. *Nutr. Clin. Pract.*, 2007; 22: 174-182
- [68] Nicholson J.K., Holmes E., Kinross J., Burcelin R., Gibson G., Jia W., Pettersson S.: Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science*, 2012; 336: 1262-1267
- [69] Orrhage K., Nord C.E.: Factors controlling the bacterial colonization of the intestine in breastfed infants. *Acta Paediatr. Suppl.*, 1999; 88: 47-57
- [70] Pai R., Kang G.: Microbes in the gut: a digestible account of host-symbiont interactions. *Indian J. Med. Res.*, 2008; 128: 587-594
- [71] Palmer C., Bik E.M., DiGiulio D.B., Relman D.A., Brown P.O.: Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol.*, 2007; 5: e177
- [72] Pappo I., Becovier H., Berry E.M., Freund H.R.: Polymyxin B reduces cecal flora, TNF production and hepatic steatosis during total parenteral nutrition in the rat. *J. Surg. Res.*, 1991; 51: 106-112
- [73] Quigley E.M.: Gut microbiota and the role of probiotics in therapy. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2011; 11: 593-603
- [74] Reinhardt C., Reigstad C.S., Bäckhed F.: Intestinal microbiota during infancy and its implications for obesity. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 2009; 48: 249-256
- [75] Roberfroid M.B.: Global view on functional foods: European perspectives. *Brit. J. Nutr.*, 2002; 88 (Suppl. 2): S133-S138
- [76] Samuel B.S., Hansen E.E., Manchester J.K., Coutinho P.M., Henrissat B., Fulton R., Latreille P., Kim K., Wilson R.K., Gordon J.I.: Genomic and metabolic adaptations of *Methanobrevibacter smithii* to the human gut. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007; 104: 10643-10648
- [77] Schrezenmeier J., de Vrese M.: Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2001; 73 (Suppl. 1): 361s-364s
- [78] Schwirtz A., Taras D., Schäfer K., Beijer S., Bos N.A., Donus C., Hardt P.D.: Microbiota and SCFA in lean and overweight healthy subjects. *Obesity*, 2010; 18: 190-195
- [79] Shanahan F.: The host-microbe interface within the gut. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, 2002; 16: 915-931
- [80] Shanahan F., Murphy E.: The hybrid science of diet, microbes, and metabolic health. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2011; 94: 1-2
- [81] Sonnenburg J.L., Chen C.T., Gordon J.I.: Genomic and metabolic studies of the impact of probiotics on a model gut symbiont and host. *PLoS Biol.*, 2006; 4: e413
- [82] Staiger H., Machicao F., Fritsche A., Häring H.U.: Pathomechanisms of type 2 diabetes genes. *Endocr. Rev.*, 2009; 30: 557-585
- [83] Stappenbeck T.S., Hooper L.V., Gordon J.I.: Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002; 99: 15451-15455
- [84] Stephani J., Radulovic K., Niess J.H.: Gut microbiota, probiotics and inflammatory bowel disease. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, 2011; 59: 161-177
- [85] Swann J.R., Want E.J., Geier F.M., Spagou K., Wilson I.D., Sidaway J.E., Nicholson J.K., Holmes E.: Systemic gut microbial modulation of bile acid metabolism in host tissue compartments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011; 108 (Suppl. 1): 4523-4530
- [86] Thomas C., Gioiello A., Noriega L., Strehle A., Oury J., Rizzo G., Macchiarulo A., Yamamoto H., Matakı C., Pruzanski M., Pellicciari R., Auwerx J., Schoonjans K.: TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis. *Cell Metab.*, 2009; 10: 167-177
- [87] Turnbaugh P.J., Ley R.E., Mahowald M.A., Magrini V., Mardis E.R., Gordon J.I.: An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*, 2006; 444: 1027-1031
- [88] Turnbaugh P.J., Quince C., Faith J.J., McHardy A.C., Yatsunenکو T., Niazı F., Affourtit J., Egholm M., Henrissat B., Knight R., Gordon J.I.: Organismal, genetic, and transcriptional variation in the deeply sequenced gut microbiomes of identical twins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010; 107: 7503-7508
- [89] Turnbaugh P.J., Ridaura V.K., Faith J.J., Rey F.E., Knight R., Gordon J.I.: The effect of diet on the human gut microbiome: a meta-genomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci. Transl. Med.*, 2009; 1: 6ra14
- [90] Vael C., Verhulst S.L., Nelen V., Goossens H., Desager K.N.: Intestinal microflora and body mass index during the first three years of life: an observational study. *Gut Pathog.*, 2011; 3: 8
- [91] Venema K.: Role of gut microbiota in the control of energy and carbohydrate metabolism. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 2010; 13: 432-438
- [92] Vijay-Kumar M., Aitken J.D., Carvalho F.A., Cullender T.C., Mwangi S., Srinivasan S., Sitaraman S.V., Knight R., Ley R.E., Gewirtz A.T.: Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5. *Science*, 2010; 328: 228-231
- [93] Vilsbøll T., Krarup T., Madsbad S., Holst J.J.: Both GLP-1 and GIP are insulinotropic at basal and postprandial glucose levels and contribute nearly equally to the incretin effect of a meal in healthy subjects. *Regul. Pept.*, 2003; 114: 115-121
- [94] Watanabe M., Houten S.M., Matakı C., Christoffolete M.A., Kim B.W., Sato H., Messaddeq N., Harney J.W., Ezaki O., Kodama T., Schoonjans K., Bianco A.C., Auwerx J.: Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation. *Nature*, 2006; 439: 484-489
- [95] Wen L., Ley R.E., Volchkov P.Y., Stranges P.B., Avanesyan L., Stenbraker A.C., Hu C., Wong F.S., Szot G.L., Bluestone J.A., Gordon J.I., Chervonsky A.V.: Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature*, 2008; 455: 1109-1113
- [96] Wong J.M., de Souza R., Kendall C.W., Emam A., Jenkins D.J.: Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J. Clin. Gastroenterol.*, 2006; 40: 235-243
- [97] Zwielerhner J., Liszt K., Handschur M., Lassl C., Lapin A., Haslberger A.G.: Combined PCR-DGGE fingerprinting and quantitative-PCR indicates shifts in fecal population sizes and diversity of Bacteroides, bifidobacteria and Clostridium cluster IV in institutionalized elderly. *Exp. Gerontol.*, 2009; 44: 440-446

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.